

De rol van HLA-E gerestricteerde CD8+ T-cellen in Multiple Sclerose

Evelien WILLEM

promotor :
dr. Niels HELLINGS

Inhoudsopgave

VOORWOORD.....	I
LIJST MET AFKORTINGEN	II
LIJST MET FIGUREN	III
LIJST MET TABELLEN.....	IV
SAMENVATTING.....	V
1 INTRODUCTIE	1
1.1 MULTIPLE SCLEROSE	1
1.1.1 <i>Etiologie en Pathologie van MS.....</i>	1
1.1.2 <i>Therapiën voor MS.....</i>	4
1.2 REGULATOIRE MECHANISMEN	6
1.2.1 <i>Natural Killer T-cellen.....</i>	7
1.2.2 <i>CD4⁺ regulatoire T-cellen</i>	7
1.2.3 <i>Anti-idiotypen en anti-ergotype T-cellen.....</i>	8
1.2.4 <i>CD8⁺ regulatoire T-cellen</i>	9
1.3 DOEL VAN DE STAGE.....	12
2 MATERIAAL EN METHODEN	13
2.1 PATIËNTEN EN GEZONDE CONTROLES	13
2.2 GEBRUIKTE CELSUSPENSIES, MEDIA EN STIMULI/ANTIGENEN	13
2.3 AANKLEURING VAN CD8 ⁺ T-CELLEN MET QDM TETRAMEREN	14
2.4 ANALYSE VAN HLA-E EXPRESSIE	15
2.4.1 <i>Bepaling van de HLA-E expressie op het celoppervlak</i>	15
2.4.2 <i>HLA-E expressie op mRNA-niveau</i>	15
2.4.3 <i>HLA-E gen klonering in een TOPO-TA vector.....</i>	17
2.5 GENEREREN VAN MBP- REACTIEVE T-CELKLONEN.....	18
2.6 CO-CULTUUR VAN CD8 ⁺ EN CD4 ⁺ T-CELLEN	19
2.6.1 <i>Isolatie en stimulatie van CD4⁺ T-cellen</i>	20
2.6.2 <i>Korte termijn co-cultuur.....</i>	20
2.6.3 <i>Lange termijn co-cultuur (in vitro assay).....</i>	22
3 RESULTATEN.....	23
3.1 AANKLEURING VAN PBMC MET HLA-E /QDM TETRAMEREN	23
3.2 HLA-E EXPRESSIE OP HET CELOPPERVAK VAN VERSCHILLENDE IMMUNOLOGISCHE CELTYPES	25
3.3 INVLOED VAN ACTIVATIE OP HLA-E OPPERVAKTE-EXPRESSIE.....	27
3.4 HLA-E EXPRESSIE OP MRNA-NIVEAU	30
3.4.1 <i>Optimalisatie PCR-reactie</i>	30

3.4.2	<i>HLA-E klonering in een TOPO-TA vector</i>	31
3.4.3	<i>Optimalisatie Real-Time PCR.....</i>	32
3.4.4	<i>Invloed van activatie op HLA-E mRNA expressie</i>	33
3.5	REACTIVITEIT VAN CD8 ⁺ T-CELLEN TEN OPZICHTE VAN CD4 ⁺ T-CELLEN IN EEN CO-CULTUUR	34
3.5.1	<i>CFSE-assay.....</i>	34
3.5.2	<i>In vitro assay.....</i>	36
4	DISCUSSIE	37
	REFERENTIES	43

Voorwoord

Deze thesis en mijn stageperiode vormen het eindstuk van mijn opleiding Biomedische Wetenschappen. Het afsluiten van een periode die de meesten omschrijven als de mooiste tijd van hun leven. Een periode van vrijheid om te ontdekken en een periode van persoonlijke ontwikkeling. Met veel enthousiasme heb ik de voorbije vier jaar doorlopen om af te ronden met een boeiende en leerrijke stageperiode.

Dit voorwoord is dan ook een dankbetuiging aan iedereen die de afgelopen jaren hebben gemaakt tot wat ze zijn geworden.

Op de eerste plaats zou ik graag mijn promotor, dr. Niels Hellings, hartelijk willen bedanken voor zijn kritische terugkoppeling tijdens deze stage. Hij wist tevens orde te scheppen in mijn schrijven en gaf verrijkend advies over de aanpak van deze thesis.

Kim Pannemans, mijn nabije stagebegeleidster ben ik ontzettend dankbaar. Dankzij haar heb ik heel veel bijgeleerd in het labo. We hebben hoogtepunten gekend en dieptes doorzwommen. Zij wierp een eerste kritische blik op mijn schrijven en heeft me fel geholpen bij het voltooien van dit werk.

Verder zou ik ook professor Stinissen, directeur Biomed willen bedanken. Hij heeft ons studenten vier jaar geloodst doorheen onze studie en de stageperiode.

Deze stage zou niet zijn gelukt zonder de bereidwillige bloeddonaoren die hun steentje aan de wetenschap wilden meedragen. Ook zij verdienen hiervoor een woord van dank. Gesterkt door de steun, de schouderklopjes en fijne babbels van mijn medestudenten aanwezig op het Biomed werd deze stageperiode een nog aangename ervaring.

Tenslotte wil ik ook mijn ouders bedanken omdat zij mij de mogelijkheid hebben gegeven om deze ervaring mee te maken. Samen met de rest van mijn gezin en mijn vriend Nicolas hebben ze mij gesteund in het volledige verloop van mijn studie. Ze bleven steeds in mij geloven en namen de energie om naar mijn ingewikkelde uitleg te luisteren en mee te leven in moeilijker momenten.

Bedankt allemaal, dankzij jullie heb ik de kans gekregen om een boeiende en leerrijke studie te voltooien. Zonder jullie allemaal was het nooit gelukt!

Lijst met afkortingen

<i>α-GalCer</i> : α-galactosylceramide	<i>LDA</i> : limiting dilution assay
<i>AICD</i> : activatie geïnduceerde celdood	<i>MBP</i> : myelin basic protein
<i>AM</i> : autoloog medium	<i>MFI</i> : mean fluorescence intensity
<i>APC</i> : antigen presenterende cel	<i>MHC</i> : major histocompatibility complex
<i>BSA</i> : bovine serum albumine	<i>mRNA</i> : messenger ribonucleic acid
<i>CD</i> : cluster of differentiation	<i>MS</i> : multiple sclerose
<i>cDNA</i> : complementarity deoxyribonucleic acid	<i>NK T-cel</i> : natural killer T-cel
<i>CDR</i> : complementarity determining region	<i>NO</i> : stikstofmonoxide
<i>CFSE</i> : 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	<i>PBMC</i> : perifeer bloed mononucleaire cellen
<i>Cpm</i> : counts per minute	<i>PBS</i> : phosphate buffered saline
<i>CTL</i> : cytotoxische T-lymfocyt	<i>PE</i> : phycoerythrine
<i>CZS</i> : centraal zenuwstelsel	<i>PerCP</i> : peridin chlorophyll protein
<i>DC</i> : dendritische cel	<i>PHA</i> : phytoheamagglutinine
<i>ΔPF</i> : delta prolifererende fractie	<i>PP</i> : primair progressief
<i>EAE</i> : experimental autoimmune encephalomyelitis	<i>Qdm</i> : Qa-1 determinant modifiers
<i>FACS</i> : fluorescence-activated cell sorter	<i>RR</i> : relapsing remitting
<i>FasL</i> : Fas-ligand	<i>RT-PCR</i> : real time polymerase chain reaction
<i>FCS</i> : foetaal kalf serum	<i>SI</i> : stimulatie-index
<i>FITC</i> : fluorescein isothiocyanate	<i>SP</i> : secundair progressief
<i>Foxp3</i> : forkhead box protein 3	<i>TAP</i> : transporter associated with antigen processing
<i>Fr</i> : framework region	<i>TCR</i> : T-cel receptor
<i>GAM</i> : goat-anti-mouse	<i>TCV</i> : T-cel vaccinatie
<i>HLA</i> : humaan leukocyt antigen	<i>TGF</i> : transforming growth factor
<i>Hsp60</i> : heat shock protein 60	<i>Th</i> : T-helper cel
<i>IFN</i> : interferon	<i>TNF</i> : tumor necrosis factor
<i>IL</i> : interleukine	<i>Treg</i> : regulatoire T-cel
<i>ILT</i> : inhibitorisch Ig-like transcript	<i>TSST-1</i> : toxic shock syndrome toxin-1
<i>KM</i> : kweekmedium	<i>TT</i> : tetanus toxoid
	<i>7AAD</i> : 7-amino actinomycine D

Lijst met figuren

- Figuur 1:** Klinische vormen van MS
- Figuur 2:** Huidige opvatting van de immuno-pathogenese van MS
- Figuur 3:** Intrinsieke homeostatische controle van antigen-geactiveerde CD4⁺ T-cellen
- Figuur 4:** De regulatoire CD8⁺ T-cel pathway
- Figuur 5:** TOPO TA klonering
- Figuur 6:** LDA assay
- Figuur 7:** Analyse de proliferatie van CD8⁺ 7AAD⁻ T-cellen
- Figuur 8:** Analyse van CD8⁺ T-cellen die interageren met de HLA-E/Qdm tetrameren
- Figuur 9:** Interactie tussen CD8⁺ T-cellen en HLA-E/Qdm tetrameren
- Figuur 10:** Analyse van de kruisreactiviteit van 3D12 met HLA-A, B en C
- Figuur 11:** HLA-E oppervlakte-expressie op verschillende immuunsubpopulaties
- Figuur 12:** HLA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen na verschillende stimulatietijden
- Figuur 13:** HA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen na lange stimulatietijden
- Figuur 14:** Optimalisatie annealingstemperatuur voor HLA-E primers
- Figuur 15:** Restrictie digestie met EcoRI na TOPO-TA klonering
- Figuur 16:** Optimalisatie MgCl₂ concentratie voor de RT-PCR
- Figuur 17:** Optimalisatie primer concentratie voor de RT-PCR
- Figuur 18:** HLA-E expressie op mRNA niveau
- Figuur 19:** ΔPF van de CD8⁺7AAD⁻ T-cellen in co-cultuur van CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen
- Figuur 20:** SI-waarden van de co-cultuur van 4x10⁴ CD8⁺ en 4x10⁴ CD4⁺ T-cellen

Lijst met tabellen

Tabel 1: Eigenschappen van de gezonde controles en MS-patiënten

Tabel 2: Overzicht van gebruikte antilichamen bij de Qdm tetrameer analyse

Tabel 3: HLA-E expressie: overzicht van gebruikte antilichamen bij FACS

Tabel 4: Gebruikte primers

Tabel 5: RT-PCR programma

Tabel 6: Opzet van de co-cultuur assay op korte termijn

Tabel 7: Percentage van CD8⁺ T-cellen die interageren met de HLA-E/Qdm tetrameren

Samenvatting

Multiple Sclerose is een auto-immune aandoening van het centrale zenuwstelsel waarbij autoreactieve T-cellen een belangrijke rol spelen. Autoreactieve T-cellen behoren niet alleen tot het immuunsysteem van MS-patiënten, maar zijn ook aanwezig in het normale T-cel repertoire van gezonde individuen waar ze niet automatisch leiden tot auto-immuniteit. Dankzij onder andere perifere regulatoire mechanismen wordt de activatie en expansie van deze pathogene autoreactieve T-cellen in bedwang houden. Eén van die regulatoire netwerken omvat $CD8^+$ regulatoire T-cellen (Tregs). Uit diermodelstudies is gebleken dat een subpopulatie van deze $CD8^+$ Tregs Qa-1 gerestricteerd zijn. Deze cellen zouden specifiek autoreactieve $CD4^+$ T-cellen kunnen onderdrukken die Qa-1 tot expressie brengen.

Deze stageperiode was gericht naar de studie van HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen, het humane homoloog van Qa-1 gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen, om een mogelijke rol voor deze regulatoire T-cellen te ontrafelen in MS-patiënten en gezonde controles. In een eerste deel werden HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen gedetecteerd met behulp van een *ex vivo* methode, met name Qdm tetrameren. Hieruit bleek dat deze HLA-E/Qdm tetrameren interageren met een klein percentage $CD8^+$ T-cellen via de CD94/NKG2A receptor, maar niet via de TCR, bij zowel gezonde controles als MS-patiënten. In een tweede deel werd de HLA-E expressie enerzijds bestudeerd op het celoppervlak van verschillende immunologische subpopulaties met behulp van flowcytometrie. Anderzijds werd op mRNA-niveau de expressie nagegaan met behulp van *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Er werd aangetoond dat HLA-E, in tegenstelling tot Qa-1, op het celoppervlak van rustende NK-, B- en T-cellen tot expressie komt. Vervolgens kon er waargenomen worden dat deze oppervlakte-expressie opgereguleerd werd na activatie en een maximale expressie-niveau bereikte na 24 uur, wat in overeenstemming is met het expressiepatroon van Qa-1. Via een co-cultuur systeem van $CD8^+$ T-cellen en geactiveerde $CD4^+$ T-cellen werd in een laatste onderdeel van de stageperiode de proliferatieve respons van de $CD8^+$ T-cellen ten opzichte van $CD4^+$ T-cellen nagegaan. $CD8^+$ T-cellen vertoonden hoge reactiviteit ten opzichte van geactiveerde HLA-E⁺ $CD4^+$ T-cellen. Er werd slechts een geringe daling van de proliferatie waargenomen indien de $CD4^+$ T-cellen geïncubeerd werden met een antilichaam gericht tegen klassieke MHC klasse I en II moleculen. Verder onderzoek zal moeten aantonen of de proliferatie van deze $CD8^+$ T-cellen HLA-E gerestricteerd is.

Onderzoek naar HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ regulatoire T-cellen kan hun rol in het ziekteproces ontrafelen en eventueel leiden tot de ontwikkeling van nieuwe en meer specifiek gerichte therapieën voor MS, waaronder T-celvaccinatie. Behandeling met TCV kan namelijk het regulatoire netwerk extra stimuleren, waardoor autoreactieve T-cellen mogelijk onderdrukt kunnen worden.

1 Introductie

1.1 Multiple Sclerose

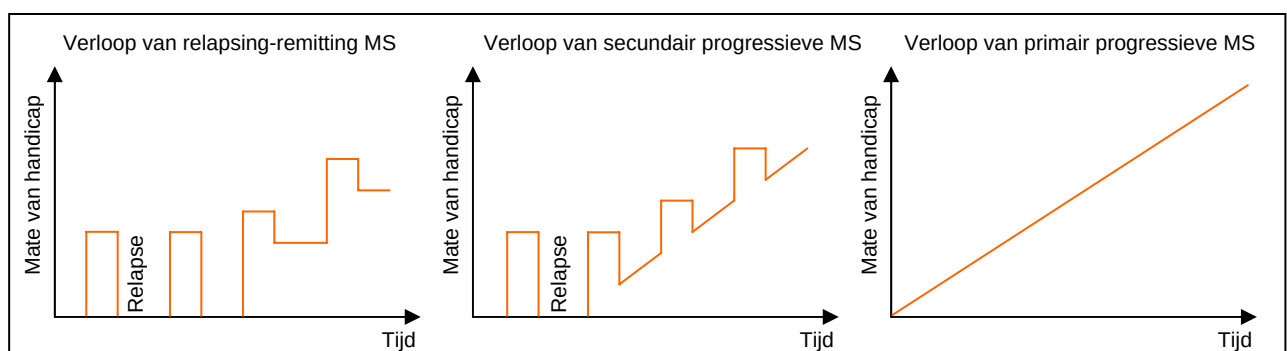
Multiple Sclerose (MS) werd voor het eerst beschreven in 1868 als een accumulatie van inflammatoire cellen in de hersenen en het ruggenmerg, het centrale zenuwstelsel (CZS), bij patiënten die episodes met neurologische dysfunctie ondervonden [1]. Recentere studies bevestigen dat MS een inflammatoire aandoening van het CZS is, die gemedieerd wordt door auto-immune processen [2].

1.1.1 Etiologie en Pathologie van MS

Wereldwijd lijden ongeveer één miljoen mensen aan MS, met de hoogste incidentie in Europa en Noord Amerika (cijfers). Bovendien ontwikkelt de ziekte zich frequent in jong volwassenen [3].

Er bestaan drie klinische vormen van MS: *Relapsing Remitting MS* (RR-MS), *Secondary Progressive MS* (SP-MS) en *Primary Progressive MS* (PP-MS). Ongeveer 85 procent van de MS-patiënten vertonen RR-MS met discrete exacerbaties en neurologische deficiënties (relaps), afgewisseld met rustige perioden van relatieve klinische stabiliteit en herstel (remissies). In 40 procent van deze patiënten zal de terugval met de tijd echter een zwaardere vorm aannemen zodat de RR-MS vorm na ongeveer 10 jaar evolueert tot een secundaire progressieve vorm (SP-MS) met een persistente verslechtering van het ziekteproces zonder herstelperiodes [2].

De overige 10 tot 15 procent van de MS-patiënten, meestal ouderen, ontwikkelen onmiddellijk een primaire progressieve vorm (PP-MS) met enkele exacerbaties maar geen remissieperiodes. Het ziekteverloop bij deze patiënten kent eerder een graduele klinische verslechtering [2].

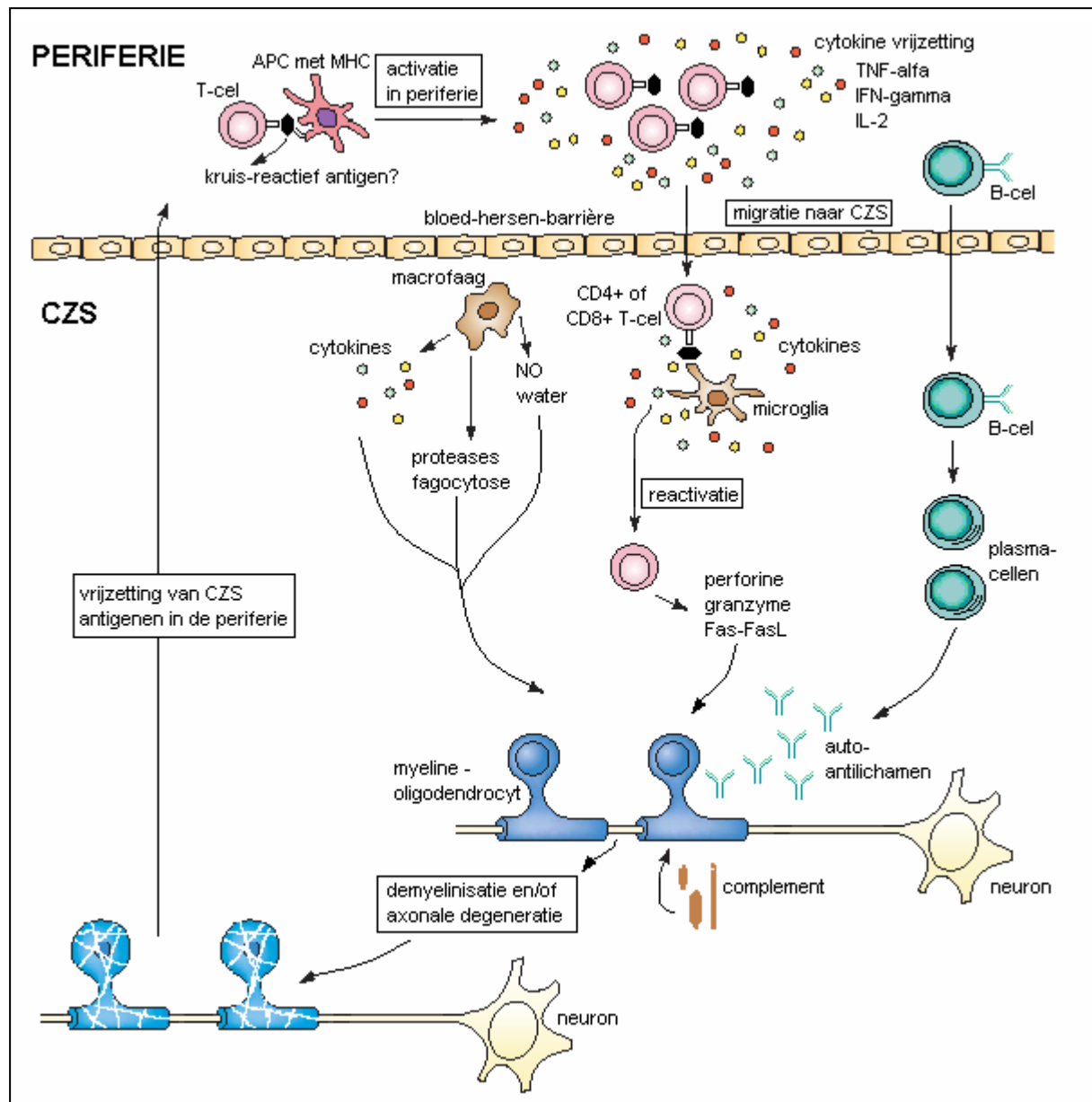


Figuur 1: Klinische vormen van MS [4]

Tot heden beperkt de diagnose zich tot de klinische symptomen en de interpretatie van radiologische informatie omdat myelinedestructie een verlaagde geleidbaarheid tot gevolg heeft [2]. Omdat MS verschillende delen van het zenuwstelsel aantast, verschillen de symptomen van patiënt tot patiënt en zullen ze daarenboven veranderen in de loop van het ziekteproces. De meest voorkomende symptomen bij MS zijn vermoeidheid, verstoring van het gezichtsvermogen en cognitieve dysfuncties. Het verlies van de normale elasticiteit in de spieren komt eveneens voor, hetgeen gepaard gaat met verkrampde spieren en spierzwakheid [3].

De exacte etiologie van MS is nog ongekend. De meest gangbare hypothese stelt dat MS gemedieerd wordt door auto-immune processen gericht tegen oligodendrocyten en hun myelineschede in het CZS, met uiteindelijk ook axonale schade tot gevolg. Pathologisch wordt MS gekenmerkt door plaques in de witte stof [2]. De opvatting dat MS een auto-immune aandoening is, vindt zijn basis in de studies van MS-lesies en diermodelstudies. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), een diermodel voor MS, heeft inzichten opgeleverd in de auto-immune en basale immunologische mechanismen. EAE wordt in proefdieren geïnduceerd door actieve immunisatie met myeline-antigenen of passieve transfer van myelinespecifieke T-cellen. Het ziekteproces in deze dieren wordt voornamelijk gemedieerd door T-helper 1 (Th1) cytokines zoals interferon- γ (IFN- γ), interleukine-2 (IL-2) en tumor necrosis factor- α (TNF- α). In tegenstelling tot deze Th1 cytokines, blijken de cytokines van T-helper 2 (Th2) cellen (IL-4, IL-5, IL-10 en IL-13) een beschermende werking te hebben. De initiërende antigenen in MS-patiënten zijn echter niet gekend en het humane cytokineprofiel is meer divers en vormt eerder een continu spectrum tussen Th1 en Th2 cytokines [5].

Een aantal factoren zouden bijdragen tot de pathogenese van MS. Uit familie- en tweelingstudies blijkt dat bepaalde genetische factoren de kans op de ontwikkeling van MS kunnen verhogen. De sterkste associatie met MS is gevonden voor humane leukocyt antigen (*HLA*)-*DR2* genen [6]. Verder dragen *HLA* klasse I allelen vermoedelijk bij aan de gevoeligheid voor MS [7] en is er in sommige studies een genetisch verband aangetoond tussen *T-cel-receptor* (*TCR*) genen en MS [8]. Genetische predispositie is echter niet voldoende om MS te ontwikkelen. Andere interagerende factoren, immunologische en omgevingsfactoren, spelen vermoedelijk ook een belangrijke rol [9].



Figuur 2: Huidige opvatting van de immuno-pathogenese van MS [5]

APC: antigeen presenterende cel, MHC: major histocompatibility complex, TNF: tumor necrose factor, IFN: interferon, IL: interleukine, NO: stikstofmonoxide, FasL: Fas-ligand, CZS centraal zenuwstelsel

De hypothese voor de pathogenese van MS ligt dus vermoedelijk in het immuunsysteem van de gastheer waarbij een trimoleculair-complex gemedieerd proces een belangrijke rol speelt. Autoreactieve T-cellen worden geactiveerd in de periferie door een nog ongekend mechanisme. Via adhesiemoleculen hechten de geactiveerde autoreactieve $CD4^+$ T-cellen zich aan het endotheel van de bloedvaten in het CZS en de productie van matrixmetalloproteinasen (MMPs) maken de doorgang door de bloed-hersen-barrière mogelijk. Vermoedelijk worden auto-antigenen in het CZS gepresenteerd aan deze autoreactieve T-cellen waardoor ze geheractiveerd worden. Hierdoor brengen de $CD4^+$ autoreactieve T-cellen

in het CZS lokale immuunreacties tot stand en produceren ze cytokines en chemokines die de migratie en activatie van andere immuuncellen bevorderen. Microglia en astrocyten, aanwezig in het CZS, worden geactiveerd en zullen optreden als antigen-presenterende cellen (APCs) die cytotoxische stoffen produceren en de inflammatie versterken. De immuuncascade leidt tot schade aan myeline en axonen, evenals de vrijzetting van antigenen in de systemische circulatie waardoor myeline-epitopen verspreid worden en er een versterkte humorale en cellulaire respons tegen auto-antigenen kan optreden [5,9] (figuur 2).

Myeline-autoreactieve T-cellen kunnen op verschillende wijzen geactiveerd worden. In een eerste hypothese veroorzaken transiënte infecties lichte schade aan oligodendrocyten, wat leidt tot de vrijzetting van myeline-epitopen die daaropvolgend myeline-reactieve T-cellen activeren [10]. Een andere manier is *bystander activatie*. Myeline-autoreactieve T-cellen worden hierbij geactiveerd in een pro-inflammatoire omgeving ten gevolge van een virale of bacteriële infectie. Pro-inflammatoire cytokines zorgen voor de opregulatie van *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-moleculen en co-stimulatoire signalen. Hierdoor zullen APCs in aantal toenemen en kan mogelijk de zelf-tolerantie doorbroken worden. Een derde hypothese is *moleculaire mimicry*. Dit is het fenomeen waarbij virusantigenen gelijkaardige epitopen/sequenties hebben als lichaamseigen (myeline)-antigenen waardoor ze kruisreageren met autoreactieve T-cellen en ze zo geactiveerd worden. Eens geactiveerd kunnen deze T-cellen het CZS infiltreren en een pathogene auto-immune cascade initiëren die uiteindelijk resulteert in myelinedestructie [11]. Een vierde hypothese is de activatie van autoreactieve T-cellen door *superantigenen*. Een superantigen bindt op het variabele deel en niet op het hypervariabele deel van de TCR enerzijds en het MHC-molecule anderzijds. Een superantigen vereist dus geen intracellulaire processing om kenbaar gemaakt te worden. Een relatief groot aantal CD4⁺ T-cellen wordt zo geactiveerd, wat leidt tot een massieve en snelle proliferatie van deze cellen en van de daaropvolgende cytokineproductie [5,9].

Autoreactieve T-cellen behoren tot het normale T-cel repertoire in gezonde individuen, maar leiden hier niet automatisch tot auto-immuniteit. Er bestaan immers perifere regulatoire mechanismen die de activatie en expansie van de pathogene autoreactieve T-cellen voorkomen [12]. Deze worden meer gedetailleerd beschreven in paragraaf 1.2.

1.1.2 Therapiën voor MS

Tot op heden is het niet mogelijk om MS te genezen, maar zijn therapieën er eerder op gericht klachten te verminderen, exacerbaties af te remmen en symptomen te bestrijden.

Een voorbeeld van dergelijke behandelingen zijn corticosteroïden. Deze hebben een ontstekingsremmend effect en zijn de eerstelijns behandeling bij acute exacerbaties. Hun effect op langere termijn is echter beperkt [5].

In de tweede plaats tracht men met immunomodulerende geneesmiddelen de ziektemechanismen van MS te controleren. Deze geneesmiddelen kunnen echter niet de aangebrachte beschadiging van het CZS herstellen. Evenmin beletten ze verdere beschadiging in de loop van het ziekteproces. Immunomodulerende geneesmiddelen zoals interferon- β (IFN- β) en glatirameer-acetaat kunnen de ontstekingsreactie en de ziekteverschijnselen afremmen. Deze therapieën helpen vooral bij patiënten met een RR-MS ziektepatroon, de invloed op het verloop van PP-MS is nog onduidelijk. Een mogelijk werkingsmechanisme van IFN- β is de inhibitie van T-celproliferatie en het verminderen van MMP-secretie. IFN- β zou ook de T-cel migratie blokkeren en de secretie van immunomodulatoire cytokines stimuleren [13]. Glatirameer-acetaat is een synthetische bereiding van verschillende aminozuren die gelijkenissen vertonen met de afbraakproducten van myeline. Vermoedelijk wordt de myeline-afbraak bij deze behandeling onderdrukt door competitie tussen glatirameer-acetaat en myeline-peptiden voor de bindingsplaats op de MHC-moleculen [5,9]. Een eenduidige behandeling voor MS bestaat echter nog niet. De huidige therapieën zijn erop gericht om inflammatie en symptomen te onderdrukken. Er is dus nood aan meer specifiekere (experimentele) behandelingen, gericht op de autoreactieve T-cel.

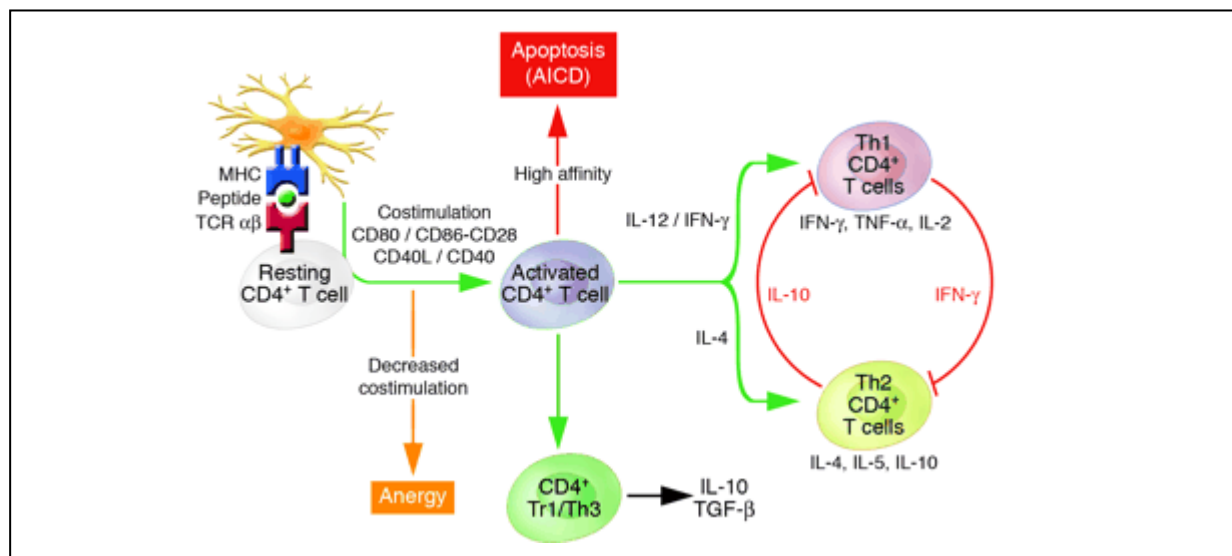
Een voorbeeld van dergelijke experimentele behandelingen is T-celvaccinatie (TCV). Hierbij wordt de patiënt gevaccineerd met autologe bestraalde auto-antigen reactieve CD4⁺ T-cellen. Uit EAE-studies is gebleken dat TCV het dier resistent maakt tegen een volgende ziekte-inductie [14]. Vaccinatie met *myelin basic protein* (MBP)-reactieve T-cellen induceert immuunresponsen die resulteren in de depletie en suppressie van circulerende MBP-reactieve T-cellen. Het exacte werkingsmechanisme van TCV is nog niet opgehelderd maar er wordt veronderstelt dat de normale regulatoire mechanismen die het immuunsysteem omvat, worden versterkt waardoor er een specifieke onderdrukking van de pathogene autoreactieve T-cel kan optreden [15].

Positieve resultaten bij diersmodellen hebben reeds geleid tot humane klinische studies waarbij het effect van TCV nagegaan wordt. Deze studies leveren inzicht in de regulatoire netwerken die gestimuleerd worden, evenals inzicht in de therapeutische effecten van TCV [15]. Bovendien zijn verdere studies vereist daar tot heden geïndividualiseerde T-cel vaccins gecreëerd moeten worden per MS-patiënt [12].

1.2 Regulatorische Mechanismen

Het immuunsysteem kent een strikte regulatie om de uitgroei en de differentiatie van autoreactieve T-cellen te voorkomen [16].

T-cel klonen die een TCR met hoge affiniteit tegen zelf-peptide-MHC complexen vertonen, worden in de thymus geëlimineerd via negatieve selectiemechanismen. Het perifere T-cel repertoire omvat echter nog T-cellen met receptoren die een lage tot intermediaire affiniteit vertonen ten opzichte van auto-antigenen, vermoedelijk omdat zij ontsnappen aan de negatieve selectiemechanismen [17]. Bijgevolg zijn regulatorische mechanismen noodzakelijk om de expansie en de effectorfunctie van deze autoreactieve T-cellen te controleren. Een eerste niveau van controle gebeurt via intrinsieke mechanismen die plaats vinden bij de initiële interactie tussen de autoreactieve $CD4^+$ T-cellen en de MHC-peptide complexen op het oppervlak van APCs. Indien de interactie tussen de $CD4^+$ T-cellen en de APCs een te hoge bindingsaffiniteit vertoont, zal dit leiden tot activatie geïnduceerde celdood (AICD). Ook co-stimulatoire ligand-interacties tussen de twee celtypes spelen een belangrijke rol. Indien deze niet adequaat genoeg zijn, worden de $CD4^+$ T-cellen anergisch of tolerant [18]. Een derde intrinsiek mechanisme omvat de differentiatie van de $CD4^+$ T-cellen, gemedieerd via cytokines. Zij bepalen de differentiatie van de naïeve Th precursorcel in een Th1 of Th2 fenotype [15,19].



Figuur 3: Intrinsieke homeostatitische controle van antigen-geactiveerde $CD4^+$ T-cellen [18]

Controle over perifere immuniteit wordt bewerkstelligd door intrinsieke mechanismen zoals apoptose, inductie van anergie en differentiatie in Th subpopulaties. MHC: major histocompatibility complex, TCR $\alpha\beta$: T-celreceptor $\alpha\beta$, AICD: activatie geïnduceerde celdood, IL: interleukine, $TGF-\beta$: transforming growth factor β , $IFN-\gamma$: interferon γ , $TNF-\alpha$: tumor necrose factor α

Klonale deletie van autoreactieve T-cellen in de thymus en de inductie van T-cel anergie alleen, verklaren echter niet het behoud van immunologische tolerantie. Extrinsieke mechanismen gemedieerd door suppressor T-cellen controleren de inductie en/of de expansie van antigen-geactiveerde T-cellen. Deze suppressor T-cellen, regulatoire T-cellen (Tregs), omvatten $CD4^+$ en $CD8^+$ T-cel populaties maar ook Natural Killer T-cellen (NK T-cellen) [18].

Regulatoire T-cellen kunnen onderverdeeld worden in twee grote groepen. Tot de eerste groep behoren Tregs die een rol spelen bij de initiële activatie en expansie van polyklonale autoreactieve T-cellen op een niet-specifieke wijze ($CD4^+$ T-cellen, NK T-cellen). Anderzijds zijn er TCR-specifieke negatieve terugkoppelingsmechanismen die van groot belang zijn bij de onderdrukking van reeds geactiveerde auto-reactieve T-cellen ($CD8^+$ regulatoire T-cellen) [19].

1.2.1 Natural Killer T-cellen

Natural Killer T-cellen (NK T-cellen) zijn natuurlijk voorkomende Tregs en vormen een brug tussen het aangeboren en verworven immuunsysteem. NK T-cellen zijn een unieke populatie die zowel receptoren van de NK cellen tot expressie brengen, alsook een TCR $\alpha\beta$. De NK T-cellen herkennen en lyseren tumorcellen die lipide antigenen tot expressie brengen die structureel gerelateerd zijn aan het glycolipide α -galactosylceramide (α -GalCer). Deze lipiden worden door het MHC klasse Ib molecule CD1d gepresenteerd aan de NK T-cel [20]. De CD1d-gerestricteerde NK T-cel is echter niet alleen betrokken bij de lysis van tumorcellen, maar speelt ook een rol in de regulatie van auto-immune aandoeningen. Indien er een interactie optreedt met de TCR $\alpha\beta$, ontwikkelt de NK T-cel immers een verhoogde *killer* activiteit en secreteert deze grote hoeveelheden cytokines die het aangeboren immuunsysteem en de Th2 cellulaire respons stimuleren, waardoor ze het auto-immune proces kunnen beïnvloeden. Een reductie in het aantal cellen of een dysfunctie van deze cellen is beide gecorreleerd met humane auto-immune aandoeningen zoals diabetes type I [21] en RR-MS [22]. Het beschermend mechanisme is echter complex en vereist interacties met andere regulatoire $CD4^+$ en $CD8^+$ T-cellen [18].

1.2.2 $CD4^+$ regulatoire T-cellen

Net zoals NK T-cellen behoren de $CD4^+$ Tregs tot de natuurlijk voorkomende Tregs. Deze Tregs worden onderverdeeld in twee grote groepen: $CD4^+CD25^+$ en $CD4^+CD25^-$ T-cellen.

Een cel-cel contact regulatorisch mechanisme speelt een belangrijke rol in de subpopulatie van CD4⁺ T-cellen die constitutief CD25 tot expressie brengen.

Diermodelstudies hebben aangetoond dat depletie van CD4⁺CD25⁺ suppressor cellen resulteert in de aanzet van verschillende systemische auto-immune aandoeningen. CD25, de α -keten van de IL-2 receptor, komt tot expressie op alle geactiveerde perifere antigeen-reactieve T-cellen. Dit molecuul is dus geen uniek differentiatie kenmerk dat de regulatorische CD4⁺ subpopulatie onderscheidt van de effector CD4⁺ T-cellen. De transcriptiefactor van de *forkhead/winged-helix* familie, de *forkhead box protein 3* (foxp3) blijkt echter wél specifiek te zijn voor regulatorische T-cellen die hun oorsprong vinden in de thymus [23-25].

CD4⁺ T-cel regulatie gebeurt niet enkel via cel-cel contact-afhankelijke mechanismen, ook cytokinesecretie speelt een belangrijke rol. CD4⁺CD25⁻ Tregs kunnen pathogene CD4⁺ autoreactieve T-cellen onderdrukken door een secretie van anti-inflammatoire en regulatorische cytokines [18,26]. Door de secretie van Th2 cytokines, zoals IL-4, wordt de ontwikkeling van Th1 cellen geïnhibeed en treedt er bescherming tegen auto-immuniteit op. Ook andere regulerende cytokines zoals IL-10 en TGF- β die zowel Th1 als Th2 immunresponsen inhiberen, zijn van belang [27-29].

1.2.3 Anti-idiotypen en anti-ergotypen T-cellen

Naast NK T-cellen en CD4⁺ T-cellen omvat het T-celrepertoire Tregs die specifiek reageren tegen oppervlaktemoleculen op pathogene effectorcellen. De oppervlaktemoleculen zijn specifieke antigenen (idiotypen) of activatie markers (ergotypen) die tot expressie komen op de autoreactieve T cel en gepresenteerd kunnen worden via MHC klasse I of II moleculen [18].

Anti-idiotypen of anti-klonotypen T-cellen herkennen vermoedelijk TCR determinanten in de *complementarity determining regions* (CDR2 en CDR3) en *framework regions* (Fr) van de variabele β ketens van de TCR [19]. Endogene TCR peptiden kunnen door zelf-MHC klasse I of II gepresenteerd worden aan Tregs. Via de normale proteïne *turn-over* kunnen TCR peptiden via MHC klasse I gepresenteerd worden, wat leidt tot de activatie van CD8⁺ Tregs. TCR peptiden van degenererende T-cellen kunnen bovendien opgenomen worden via APCs en vervolgens aan CD4⁺ Tregs gepresenteerd worden via MHC klasse II moleculen [18,24].

Anti-ergotypen Tregs zijn minder goed gekarakteriseerd. Studies hebben aangetoond dat naïeve ergotypen T-cellen een CD8⁺ of CD4⁺ fenotype vertonen en een TCR $\alpha\beta$ ⁺ of een TCR $\gamma\delta$ ⁺ hebben [30]. Deze T-cellen reageren op de proliferatie van autoloog geactiveerde T-cellen via een direct cel-cel contact. Moleculen kunnen als ergotypen beschouwd worden indien ze tot

expressie komen op of gepresenteerd worden door geactiveerde T-cellen en indien ze anti-ergotype T-cellen activeren. Mogelijke ergotopen zijn de TCR, CD25 en *heat shock protein 60* (Hsp60) [31].

1.2.4 CD8⁺ regulatoire T-cellen

In tegenstelling tot NK T-cellen en CD4⁺ Tregs zijn CD8⁺ Tregs niet constitutief aanwezig. Een subpopulatie CD8⁺CD28⁻ T-cellen zijn antigeen-specifiek en kunnen de immuunrespons onderdrukken door rechtstreeks te interageren met antigeen-presenterende dendritische cellen (DC) waardoor deze tolerogeen worden. De onderdrukking gebeurt via een opregulatie van de inhibitoire *Ig-like transcript 3* (ILT3) en ILT4 receptoren die tot expressie komen op de DCs [32].

Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ Tregs vormen een tweede groep van CD8⁺ Tregs. Bewijs dat deze subgroep van regulatoire CD8⁺ T-cellen een belangrijke rol speelt bij de onderdrukking van autoreactieve T-cellen komt uit diermodellen waarin de regulatie van anti-MBP responsen in EAE bestudeerd werd. Qa-1 is een niet-klassiek MHC klasse Ib molecule dat vooral tot expressie komt op het oppervlak van geactiveerde T-cellen. Het heeft een beperkte polymorfe structuur en presenteert een beperkt repertoire van endogene peptiden, afgeleid van de signaalsequentie van klassieke MHC klasse Ia moleculen [33].

Deze MHC Ia afgeleide peptiden, ook wel *Qa-1 determinant modifiers* (Qdm) genoemd, worden gepresenteerd door Qa-1 via een *transporter associated with antigen processing* (TAP)-afhankelijke wijze. Het resulterende Qa-1-peptide-complex bindt specifiek aan CD94/NKG2A receptoren op NK-cellen en een subpopulatie van CD8⁺ cytotoxische T-lymfocyten (CTL). Deze interactie leidt tot een inhibitie van de NK activiteit of CD8⁺ cytolytische activiteit [16,34,35].

Recente studies hebben echter aangetoond dat Qa-1 niet enkel met de CD94/NKG2A receptor op CD8⁺ T-cellen interageert maar ook met een TCR $\alpha\beta$. Deze interactie komt tot stand na presentatie van TCR-afgeleide peptiden, maar ook andere peptiden zoals hsp60-peptiden via Qa-1. Interactie van deze Qa-1 / peptide complexen en de TCR $\alpha\beta$ op CD8⁺ T-cellen, promoten de activatie, expansie en effectorfunctie van deze CD8⁺ T-cellen. Uit diermodellen is gebleken dat CD4⁺ T-cellen Qa-1-TCR V β motieven tot expressie brengen, en op deze manier herkend worden door precursor CD8⁺ Tregs. Deze Tregs interageren via hun TCR $\alpha\beta$ met de CD4⁺ T-cellen en worden op deze wijze geïnduceerd tot differentiatie, wat leidt tot de

onderdrukking van alle CD4⁺ T-cellen die de Qa-1-TCR V β motieven tot expressie brengen [16,34,35].

Uit EAE-modellen met Qa-1-deficiënte proefdieren blijkt dat de primaire auto-immuunrespons onveranderd is, maar dat de secundaire respons gericht tegen de auto-antigenen sterk is toegenomen. Een karakteristieke eigenschap van de regulatoire CD8⁺ Tregs is namelijk het feit dat Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cellen een eerste priming door de geactiveerde CD4⁺ T-cellen tijdens de primaire respons nodig hebben om de secundaire respons vervolgens te reguleren. Dit onderscheidt de CD8⁺ Tregs van de andere cellulaire regulatoire *pathways* die de expansie van autoreactieve T-cel populaties in de initiële fase van de primaire respons onderdrukken. Doordat de CD8⁺ Tregs een eerste priming vereisen, controleren ze de perifere immuniteit specifiek en efficiënter [16,34,35] (figuur 4).

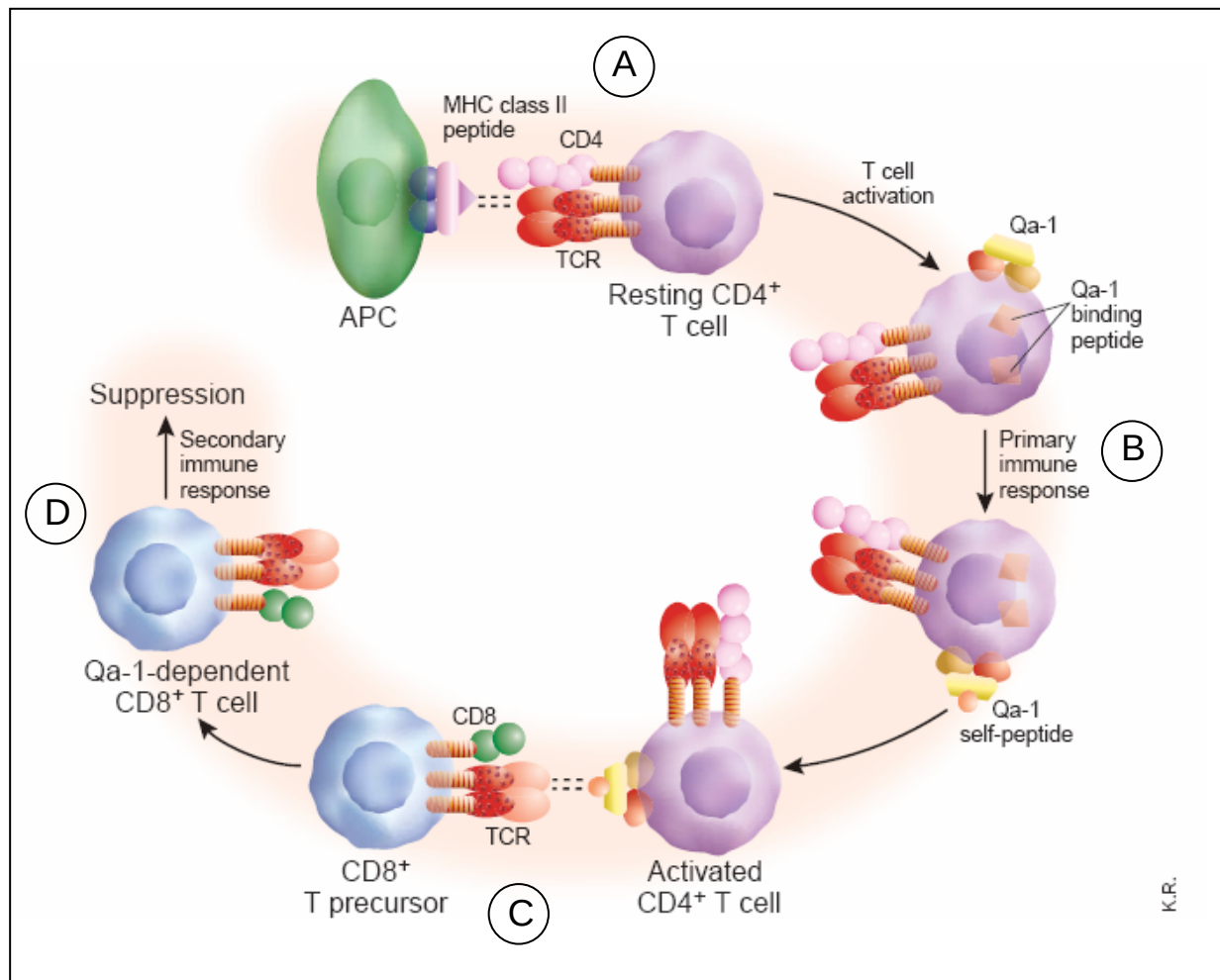
Zoals eerder vermeld is TCV een experimentele therapie die leidt tot ziekte-resistentie in proefdiermodellen zoals EAE. Het therapeutisch effect van TCV is in EAE onder andere afhankelijk van de inductie van CD8⁺ T-cellen die Qa-1-peptide complexen herkennen op de CD4⁺ T-cellen in het vaccin en de circulerende CD4⁺ targetcellen. Studies suggereren dat TCR V β afgeleide peptiden geassocieerd met Qa-1 op geactiveerde autoreactieve CD4⁺ T-cellen CD8⁺-afhankelijke onderdrukking activeren en auto-immuniteit inhiberen [14,36].

De Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cel interageert bij voorkeur met de autoreactieve T-cel via presentatie van TCR-peptiden in complex met Qa-1 moleculen (anti-idiotyp). Aangezien uit studies blijkt dat de oppervlakte-expressie van Qa-1 opmerkelijk stijgt na activatie, dragen de Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cellen ook eigenschappen van anti-ergotype Tregs [14,36].

Hoewel het precieze mechanisme nog ontrafeld moet worden, tonen verschillende EAE-studies de centrale rol van Qa-1-peptide complexen aan in de inductie van TCV- gemedieerde bescherming [36].

HLA-E is het humane functionele equivalent van het murine Qa-1-molecule. Verschillende eigenschappen van de niet-klassieke MHC klasse I moleculen zijn geconserveerd gebleven doorheen de evolutie [37]. HLA-E en Qa-1 blijken relatief non-polymorf en komen vooral tot expressie op het oppervlakte van geactiveerde T-cellen [16,36]. Verder binden Qa-1 en HLA-E gelijkaardige nonapeptiden, met ankerplaatsen op de tweede en negende positie. De nonameren vertonen een sterke affiniteit voor Qa-1 en HLA-E indien ze op positie twee een leucine of methionine en op positie negen een leucine hebben [38]. De beschikbaarheid van het nonameer peptide is vereist voor een stabilisatie van endogene HLA-E en Qa-1 expressie op het oppervlakte van de cel [39]. Een verdere gelijkenis tussen Qa-1 en HLA-E bestaat erin

dat beide moleculen gelijkaardige kwalitatieve en kwantitatieve expressiepatronen naar voor brengen [37,39].



Figuur 4: De regulatoire CD8⁺ T-cel pathway [35]

De regulatoire CD8⁺ T-cel pathway is ingedeeld in verschillende stappen: Initieel worden naïve CD4⁺ T-cellen geactiveerd tijdens de primaire immuunrespons, waar de TCR van de CD4⁺ T-cel interageert met de MHC klasse II-peptide complexen op antigen presenterende cellen (A). Deze initiële interactie induceert de oppervlakte-expressie van Qa-1-autopeptide-complexen op de CD4⁺ T-cel (B). Deze Qa-1-autopeptide structuren worden herkend door de TCR $\alpha\beta$ op CD8⁺ Tregs (C). Deze Tregs differentiëren vervolgens tot effectorcellen die alle CD4⁺ T-cellen die het Qa-1-autopeptide complex tot expressie brengen, onderdrukken (D).

TCR V β -specifieke CD8⁺ T-cellen komen ook voor in humaan perifere bloed. Ze kunnen autologe CD4⁺ T-cellen lyseren, deels gebaseerd op de TCR V β motieven die erdoor tot expressie gebracht worden. Tot heden is echter nog niet gekend of deze CD8⁺ T-cellen HLA-E gerestricteerd zijn [16].

De rol van HLA-E bij auto-immuniteit is nog onduidelijk, maar de gelijkenissen met Qa-1 doen een gelijkaardige functie vermoeden [3,35]. Verdere studies in de immunoregulatoire

pathways die leiden tot de mogelijke inductie van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen, kunnen inzicht leveren in de immunopathofysiologie van humane auto-immune aandoeningen en mogelijk leiden tot therapeutische strategieën om deze ziekten te bestrijden en te behandelen [16,36].

1.3 Doel van de stage

Deze stage is gericht naar de humane CD8⁺ regulatoire mechanismen en omvat meer specifiek de studie naar de rol van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen in gezonde controles en MS-patiënten. Via een *ex vivo* methode worden HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen gedetecteerd. Deze methode maakt gebruik van HLA-E tetrameren opgeladen met een peptide dat hoge affiniteit vertoont voor HLA-E. Verder wordt de HLA-E expressie op verschillende immuun celtypes bestudeerd met behulp van flow cytometrie en wordt de HLA-E kinetiek nagegaan op verschillende tijdstippen na activatie, zowel op oppervlakte/eiwit-expressie als op mRNA niveau. Via een co-cultuur assay wordt nagegaan of CD8⁺ T-cellen prolifereren in respons op gestimuleerde HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen en wordt er gezocht naar een optimale detectie en isolatie methode van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen. Hiervoor wordt met behulp van een *in vitro limiting dilution assay* (LDA) opgezuiverde CD8⁺ T-cellen gestimuleerd met zowel bestraalde gestimuleerde CD4⁺ T-cellen, die HLA-E tot expressie brengen, als met bestraalde geactiveerde MBP-reactieve HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen.

Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is de studie van eventuele verschillen tussen HLA-E gerestricteerde CD8⁺ Tregs in MS-patiënten en gezonde individuen om zo hun bijdrage in het ziekteproces te ontrafelen. Deze kennis kan vervolgens gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe en specifiekere (experimentele) therapieën voor MS.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Patiënten en gezonde controles

Voor de experimenten werd gebruik gemaakt van mononucleaire cellen van perifere bloed (PBMC) van 13 gezonde controles en 2 MS-patiënten. Een overzicht van deze donors wordt weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Eigenschappen van de gezonde controles en MS-patiënten

Donor	Geslacht (M/V)	Leeftijd	Type MS	Ziekte duur (jr)	Behandeling
MS-patiënt					
OIC	V	48	RR-MS	11	TCV
VAL	M	28	RR-MS	3	TCV
Gezonde controle					
THM	V	28	NVT	NVT	NVT
RUI	V	46	NVT	NVT	NVT
JAS	V	22	NVT	NVT	NVT
PAK	V	23	NVT	NVT	NVT
GOC	V	25	NVT	NVT	NVT
LIE	V	23	NVT	NVT	NVT
DEA	V	54	NVT	NVT	NVT
VEV	V	25	NVT	NVT	NVT
GIB	V	46	NVT	NVT	NVT
BOC	V	38	NVT	NVT	NVT
SLL	V	25	NVT	NVT	NVT
DAR	V	31	NVT	NVT	NVT
VAJ	M	27	NVT	NVT	NVT

NVT: niet van toepassing; TCV: T-celvaccinatie

2.2 Gebruikte celsuspensies, media en stimuli/antigenen

PBMC werden geïsoleerd met behulp van een Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Deze cellen werden vervolgens gekweekt in RPMI-1640 medium met 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren (Invitrogen Life Technologies, Paisely, Schotland) en 10% geïnactiveerd foetaal kalf serum (FCS, HyClone, Erembodegem, België) (kweekmedium, KM) of 10% geïnactiveerd autoloog serum (autoloog medium, AM). MBP werd geïsoleerd uit de witte stof van humane hersenen zoals eerder beschreven [2]. De volgende stimuli werden toegepast: *Tetanus toxoid* (TT, 2.5Lf/ml),

verkregen via RIVM (Bilthoven, Nederland), *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* (TSST-1) (Sigma Diagnostics, Sigma Aldrich, Bornem, België, 0.1 µg/ml), anti-CD3 (kloon 2G3, eigen productie, BIOMED, Diepenbeek, 2 µg/ml) en CD3CD28 *dynabeads* (DynaL Biotech ASA, Oslo, Noorwegen, waarvan 1.25 µl dynabeads werden toegevoegd per 5x10⁵ T-cellen).

Naast PBMC werd er in de onderzoeksstage gebruik gemaakt van twee kankercellijnen: CACO-2, epitheliale colonkankercellen (ATCC nr: HTB-37) en MCF-7, epitheliale borstkankercellen (ATCC nr: HTB-22). De CACO-2 cellijn werd opgekweekt in DMEM (Invitrogen Life Technologies, Paisely, Schotland) met 10% FCS, de MCF-7 cellijn werd opgekweekt in RPMI-1640 medium met 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren en 20% geïnactiveerd FCS.

2.3 Aankleuring van CD8⁺ T-cellen met Qdm tetrameren

Qdm tetrameren, verkregen van prof. Braud, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Frankrijk, werden gebruikt om HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen te detecteren. Deze tetrameren zijn opgebouwd uit vier MHC-biotine eenheden opgeladen met een Qdm-epitoot. Via biotine-avidine interacties zijn deze complexen gekoppeld aan streptavidine, gelabeld met fluorochroom *phycoerythrine* (PE). PBMCs van gezonde controles en MS-patiënten werden geïsoleerd met behulp van Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie. 5x10⁵ PBMCs werden vervolgens geresuspendeerd in FACS-buffer (1x *phosphate buffered saline* (PBS) met 2% FCS en 0.1% natrium-azide) in een 96 well microtiterplaat met V-bodem (Greiner bio-one, Frickenhause, Duitsland). De PBMCs werden 30 min geïncubeerd op 4°C met de tetrameren, CD8-PerCP (*peridin chlorophyll protein*) en CD3-FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (zie tabel 2) (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Om na te gaan of de

Tabel 2: Overzicht van gebruikte antilichamen bij de Qdm tetrameer analyse

Kleuring	FITC	PE	PerCP	Blocking antilichaam
1	IgG1	IgG2a	-	-
2	CD3	Tetrameer	CD8	-
3	CD3	Tetrameer	CD8	NKG
4	CD3	Tetrameer	CD8	TCR

Qdm tetrameren interageren met de CD94/NKG2A receptor of de TCR-αβ, werden de PBMC geïncubeerd met het antilichaam DX22 (0.554 mg/ml, eveneens verkregen van prof. Braud) gericht tegen de CD94/NKG2A receptor of met een antilichaam gericht tegen de TCR-αβ (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Analyse gebeurde met behulp van een BD

FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Erembodegem, België) en BD Cellquest software.

2.4 Analyse van HLA-E expressie

De HLA-E expressie werd zowel op het celoppervlak geanalyseerd als op het mRNA-niveau. Hiervoor werden PBMCs geïsoleerd uit het bloed van gezonde controles. Er werd gebruik gemaakt van twee negatieve controles: CACO-2, een epitheliale colonkanker cellijn en MCF-7, een epitheliale borstkanker cellijn.

HLA-E expressie op het celoppervlak werd nagegaan via flow cytometrie. Op mRNA-niveau werd de expressie bestudeerd met behulp van *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2.4.1 Bepaling van de HLA-E expressie op het celoppervlak

De HLA-E expressie op het celoppervlak van PBMC werd voor en na activatie onderzocht met behulp van een flow cytometrische kleuring. PBMCs werden geresuspendeerd in FACS-buffer in een 96 well microtiterplaat met V-bodem aan een densiteit van 5×10^5 cellen per well. De cellen werden vervolgens 30 minuten geïncubeerd op 4°C met antilichamen gericht tegen specifieke merkers op verschillende immunologische celtypes in combinatie met een primair antilichaam 3D12, gericht tegen HLA-E, verkregen van prof. dr. Geraghty (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), dat op zijn beurt gedetecteerd werd met een secundair geit-anti-muis (GAM) IgG1 FITC-gelabeld antilichaam (Serotec, Kidlington, UK) (zie tabel 3). Als interne controle voor het secundair antilichaam, werden de PBMCs aangekleurd met enkel het secundaire FITC-gelabelde antilichaam. Natural Killer cellen werden aangekleurd door een antilichaam toe te voegen tegen de oppervlaktemerker CD56, namelijk anti-CD56-PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België). B-cellen werden aangekleurd met behulp van anti-CD19-PE en T-cellen werden aangekleurd met anti-CD4-PerCP en anti-CD8-PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Verdere informatie over de activatie-status van de cellen werd verkregen via een kleuring tegen de activatiemarkers CD69 (vroeg activatie) en CD25 (late activatie) met behulp van respectievelijk anti-CD69-PE en anti-CD25-PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België).

2.4.2 HLA-E expressie op mRNA-niveau

mRNA werd geïsoleerd uit PBMCs met behulp van de *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium). Hieruit werd vervolgens cDNA gesynthetiseerd (cDNA

synthese kit, Promega, Leiden, Nederland). De kwaliteit van het bekomen cDNA werd gecontroleerd via PCR voor het TCR C β gen (tabel 4) en gecontroleerd op een 1% agarose gel.

Tabel 3: HLA-E expressie: overzicht van gebruikte antilichamen bij FACS

Kleuring	FITC	PE	PerCP
HLA-E expressie op verschillende immunologische celtypes			
1	IgG1	IgG2a	-
2	GAM IgG1	-	-
3	3D12/GAM IgG1	-	-
4	3D12/GAM IgG1	-	CD4
5	3D12/GAM IgG1	-	CD8
6	3D12/GAM IgG1	CD56	-
7	3D12/GAM IgG1	CD19	-
HLA-E expressie na activatie			
1	GAM IgG1	-	-
2	3D12/GAM IgG1	-	-
3	3D12/GAM IgG1	CD25	CD4
4	3D12/GAM IgG1	CD69	CD4
5	3D12/GAM IgG1	CD8	CD4

Aan de hand van de HLA-E gensequentie werden specifieke primers voor HLA-E ontworpen via Oligo 6 software (tabel 4). Om de HLA-E expressie op mRNA niveau te kwantificeren, werd gebruik gemaakt van *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (*LightCycler*, Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium). RT-PCR geeft meer specifieke en accurate resultaten ten opzichte van de traditionele PCR die enkel het eindpunt weergeeft in de plateaufase en niets vertelt over de kinetiek van de PCR-reactie. Bij RT-PCR wordt er gebruik gemaakt van *SyberGreen*, een fluorescente stof die dubbelstrengig DNA bindt waardoor een meetbaar fluorescent signaal wordt weergegeven dat proportioneel correspondeert met de hoeveelheid geamplificeerd PCR-product aanwezig bij elke cyclus. De cyclus waarbij de fluorescentie een bepaalde threshold (Ct) overschrijdt, geldt als maat voor de initiële hoeveelheid cDNA in elke staal. Aan de hand van een standaardcurve werd de concentratie van het HLA-E gen in de onbekende stalen berekend. Deze standaardcurve bestaat uit een verdunningsreeks van plasmide DNA waarin het HLA-E-gen gekloneerd werd met behulp van een TOPO TA vector (Invitrogen Life Technologies, Paisely, Schotland). Het logaritme

van de hoeveelheid plasmide-DNA (ng, X-as) wordt in lineair verband gebracht met de threshold Ct (Y-as) [41]. De verschillende hoeveelheden specifiek HLA-E transcript werd in ieder staal gecorrigeerd genormaliseerd ten opzichte van de concentratie van het GAPDH huishoudgen in eenzelfde staal bepaald in een aparte analyse. Het programma voor de RT-PCR is beschreven in tabel 5.

Tabel 4: HLA-E primers

Primer	mRNA sequentie	Positie	Smelttemp	% GC
HLA-E upper primer	5'TGCGCGGCTACTACAATCAG 3'	343 (5')	67.2°C	55.0%
HLA-E lower primer	5'TGTCGCTCCACTCAGCCTTA 3'	1064 (3')	66.2°C	55.0%
GAPDH upper primer	5'GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC 3'	-	-	-
GAPDH lower primer	5'CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT 3'	-	-	-
Ct upper primer	5'CCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCAT 3'	-	-	-
Ct lower primer	5'CTCTTGACCATGGCCATC 3'	-	-	-

Tabel 5: RT-PCR programma

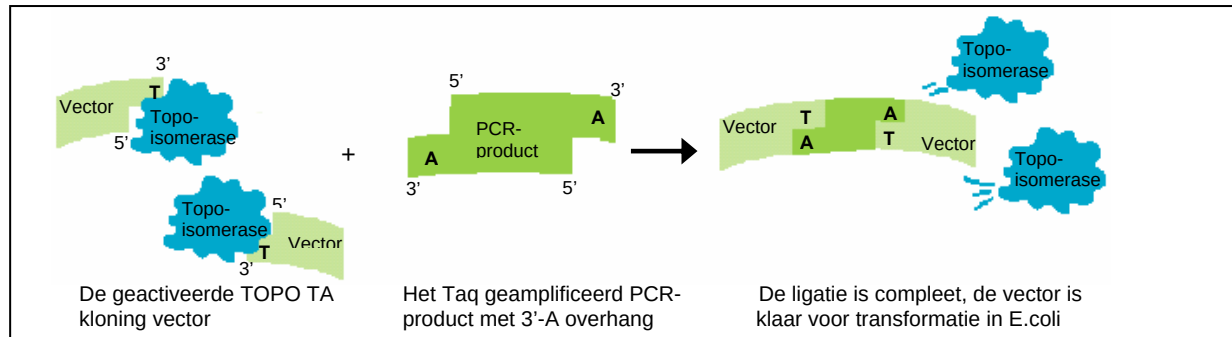
		Temperatuur	Tijd
Predenaturatie (1x)	Predenaturatie	95°C	10'
Cycli (50x)	Denaturatie	95°C	1''
	Annealing	64°C	5''
	Elongatie	72°C	30''
	Meten	90°C *	-
Smeltcurve (1x)	Denaturatie	95°C	-
	Annealing	65°C	12''
	Melting	95°C	-
Afkoelen (1x)	Afkoelen	40°C	-

* Primer-dimeren rond de 75° worden op deze wijze uit de analyse gesloten

2.4.3 HLA-E gen klonering in een TOPO-TA vector

Het HLA-E PCR-product werd gekloneerd in een TOPO-TA vector met behulp van de restrictie- en ligatie capaciteiten van topo-isomerase. Vervolgens werd dit recombinante plasmide in *E.coli* cellen getransformeerd en werden de bacteriën opgegroeid op een agarbodem. Selectie van de getransformeerde bacteriën gebeurde op basis van blauw-wit selectie: door inactivatie van het LacZ gen vormen cellen mét de recombinante vector witte kolonies. Na het oppikken van deze witte kolonies werden ze verder aangereikt in LB-medium. Via een *midi-preparation* methode werd het plasmide-DNA uit deze kolonies opgezuiverd (Plasmid Midi kit Qiagen, Venlo, Nederland). Met behulp van restrictie-digestie

werd de aanwezigheid van het gekloneerde fragment gecontroleerd op een 1% agarose gel. Sequentie-PCR werd vervolgens toegepast om de specificiteit van het gekloneerde DNA te bepalen [42].



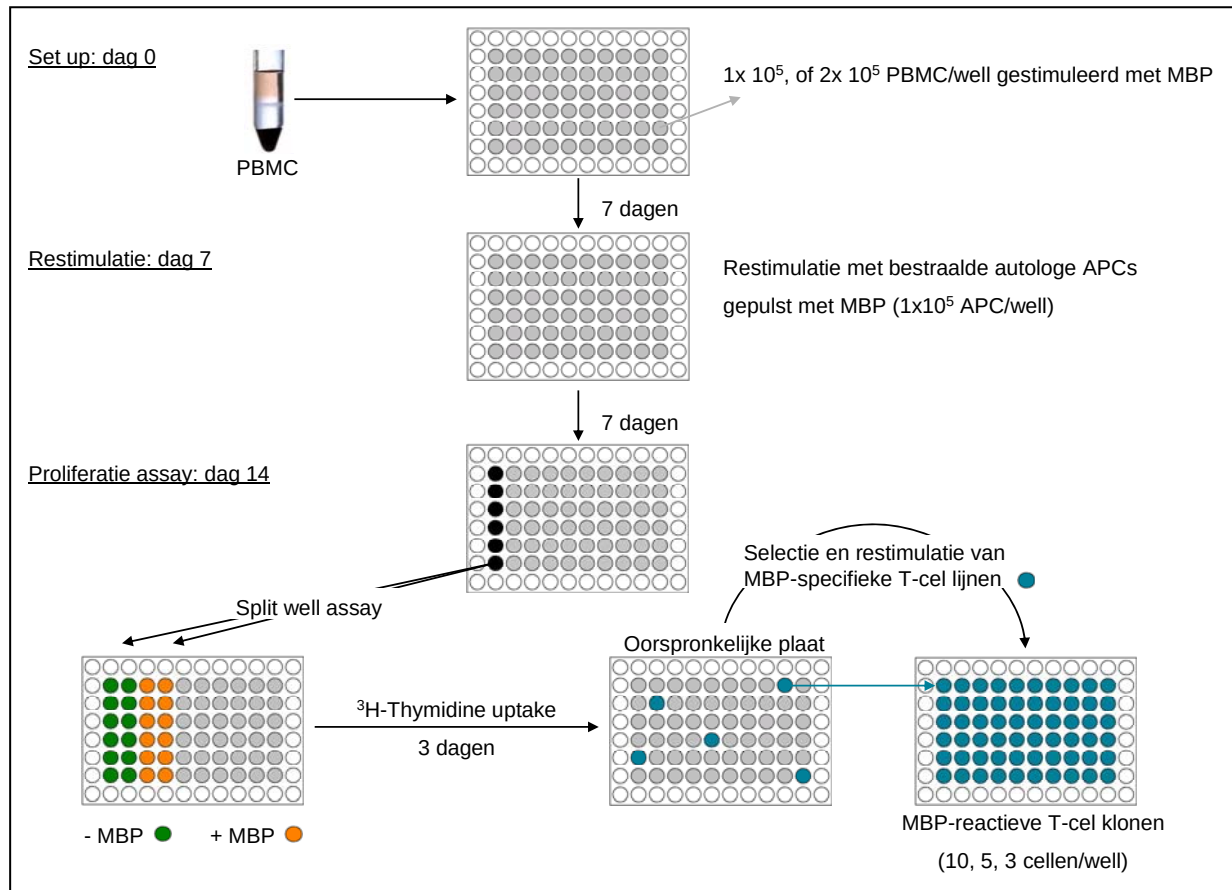
Figuur 5: TOPO TA klonering

2.5 Genereren van MBP- reactieve T-celklonen

MBP-reactieve T-celklonen werden gegenereerd via een *limiting dilution* assay (LDA) (figuur 6). Hiervoor werden uit het bloed van gezonde controles PBMC geïsoleerd en gekweekt in autoloog medium in 60 wells van een 96-well microtiterplaat met U-bodem (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken) aan een densiteit van enerzijds 1×10^5 en anderzijds 2×10^5 cellen per well in aanwezigheid van MBP (40 $\mu\text{g/ml}$). Na 7 dagen werden de PBMC gerestimuleerd met MBP-gepulste, bestraalde autologe antigeen presenterende cellen (APCs) ($1 \times 10^5/\text{well}$). Vervolgens werd na 24 uur recombinant interleukine-2 (IL-2, 2.5 U/ml, Roche diagnostics, Vilvoorde, België) als extra groeistimulus aangereikt. Groeipositieve lijnen werden op dag 14 getest via een split-well assay. Hiervoor werd de helft van de cellen in iedere well verdeeld over vier gelijke aliquots. Aan twee van deze aliquots werden MBP-gepulste en bestraalde autologe APCs toegevoegd, aan de overige twee werden niet-gepulste, bestraalde APCs toegevoegd. Na drie dagen werd de specifieke reactiviteit bepaald aan de hand van een ^3H -Thymidine incorporatie assay waarbij 1/20 verdund ^3H -Thymidine (Amersham Biosciences, Diegem, België) werd toegevoegd. ^3H -Thymidine incorporeert zich in het DNA van prolifererende cellen en geeft een radioactief signaal.

Na 16 uur incubatie werden de cellen geharvest (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, USA) en werd de radioactiviteit van ^3H -thymidine nagegaan via een β -scintillatietelling uitgedrukt in *counts per minute* (cpm). Een lijn wordt als positief beschouwd indien de stimulatie-index (SI, cpm in aanwezigheid van MBP ten opzichte van cpm in afwezigheid van MBP) minstens 3 bedraagt. De positieve T-cel lijnen werden verder gekloneerd door de cellen

uit te platen aan drie verschillende densiteiten (10, 5 en 3 cellen/well) in aanwezigheid van bestraalde APCs, *phytohaemagglutinine* (PHA, 4µg/ml, Difco, Detroit, MI, USA) en IL-2 (5U/ml). Groeipositieven werden opnieuw gescreend via de hierboven beschreven split well assay.



Figuur 6: LDA assay

2.6 Co-cultuur van CD8^+ en CD4^+ T-cellen

Om de reactiviteit van CD8^+ T-cellen ten opzichte van CD4^+ T-cellen te bepalen, werd er gebruik gemaakt van een co-cultuur systeem. In een korte termijn assay (10 dagen) werd met behulp van *5,6-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) de proliferatie nagegaan van CD8^+ T-cellen ten opzichte van autologe CD4^+ T-cellen die vooraf geactiveerd werden. In een lange termijn assay (14 dagen) werd analoog aan de bovenbeschreven LDA assay de proliferatie van CD8^+ T-cellen gemeten ten opzichte van geactiveerde CD4^+ T-cellen.

2.6.1 Isolatie en stimulatie van CD4⁺ T-cellen

Via RosetteSep (Stemcell Technologies, België) werden CD4⁺ T-cellen uit PBMCs geïsoleerd. In deze techniek worden ongewenste immuunsubsets (alle niet-CD4⁺ T-cellen) in de PBMC-fractie via antilichamen gelinkt aan de rode bloedcellen waardoor na een Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie enkel gezuiverde CD4⁺ T-cellen overblijven. De CD4⁺ T-cellen werden vervolgens 24 uur (optimale HLA-E expressie) gestimuleerd met CD3CD28 dynabeads (waarvan 1.25µl dynabeads werden toegevoegd per 5x10⁵ T-cellen) of anti-CD3 (2µg/ml).

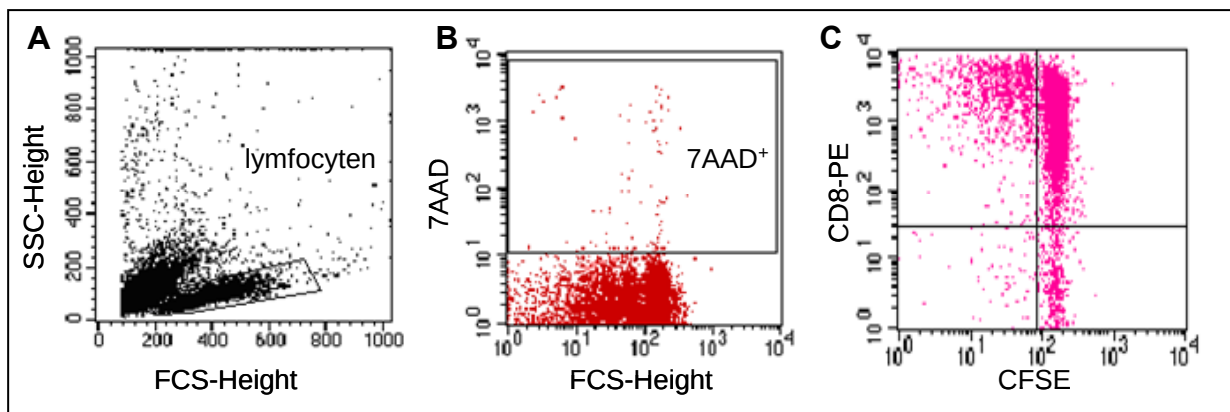
2.6.2 Korte termijn co-cultuur

CD8⁺ T-cellen werden na de klassieke Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie uit PBMCs geïsoleerd via een negatieve CD8⁺ T-cel isolatie (Dynabeads, Dynal Biotech ASA, Oslo, Noorwegen). Zuiverheid van deze fractie werd nagegaan met behulp van flow cytometrie. Deze CD8⁺ T-cellen werden vervolgens met de fluorescerende kleurstof CFSE gelabeld. Met behulp van de CFSE assay kunnen prolifererende T-cellen in vitro geïdentificeerd worden op basis van een verdunning van CFSE, waarmee de T-cellen op voorhand gelabeld zijn. CFSE is opgebouwd uit twee acetaat-delen en een functionele groep, de succinimidyl ester. CFSE wordt intracellulair opgenomen en wordt met behulp van esterases gemodificeerd zodat CFSE niet meer doorheen de celmembraan kan en een fluorescent signaal gegenereerd wordt. De succinimidyl ester reageert met vrije aminogroepen waardoor *dye-protein* complexen gevormd worden. Bij elke celdeling halveert de fluorescentie van de CFSE gelabelde cellen door een gelijkmatige verdeling over de dochtercellen, waardoor de gedeelde fractie eenvoudig geïdentificeerd kan worden via flow cytometrie [43].

Een 10mM stockoplossing van CFSE (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Nederland) werd verdund in PBS tot een werkoplossing van 2µM. Voor de labeling werden CD8⁺ T-cellen geresuspendeerd in PBS/0.1% *bovine serum albumine* (BSA, US Biological, Swampscott, MA) tot een concentratie van 20 miljoen cellen/ml. Hieraan werd een gelijk volume CFSE werkoplossing toegevoegd (eindconcentratie 1µM). De cellen werden vervolgens gedurende 7 minuten geïncubeerd op 37°C. Ongebonden CFSE werd weggewassen door de CD8⁺ T-cellen te resuspenden in kweekmedium gevolgd door een incubatie van 30 minuten bij 37°C. In een laatste stap werden de cellen geresuspendeerd in een geschikt volume KM.

De geïsoleerde en gelabelde CD8⁺T-cellen werden uitgeplaat aan een densiteit van 1x10⁵ en 2x10⁵ cellen per well in een 96- well microtiterplaat met U-bodem. Voor iedere celdensiteit

werden drie verschillende condities in triplo opgezet zoals aangegeven in tabel 5. De geactiveerde $CD4^+$ T-cellen die toegevoegd werden in de co-cultuur werden geïsoleerd en gestimuleerd zoals beschreven in paragraaf 2.7.1. Vervolgens werden deze cellen bestraald om verdere (groei)activiteit in de co-cultuur te voorkomen. Na bestraling werden de $CD4^+$ T-cellen al dan niet geïncubeerd met antilichamen gericht tegen de klassieke MHC klasse I en II moleculen met behulp van de respectievelijke monoklonale antilichamen W6/32 en L243 (10 μ g/ml, ATCC, Becton Dickinson, Erembodegem, België). Aan de hand van flow cytometrie werd op dag 5, dag 7 en dag 10 de fractie prolifererende $CD8^+$ T-cellen bepaald. Hiervoor werden de cellen uit de co-culturen geresuspendeerd in FACS-buffer en geïncubeerd met een antilichaam tegen CD8, met name anti-CD8-PE. Bovendien werd gebruik gemaakt van een negatieve controlekleuring, IgG1-FITC/IgG2a-PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Om apoptotische cellen uit te sluiten, werd de CD8-PE-kleuring gecombineerd met kleuring met 7-amino actinomycine D (7AAD) (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Indien door apoptose de plasma membraan integriteit verloren is, kan 7AAD binden aan het DNA. Vroeg apoptotische cellen nemen weinig 7AAD op, laat apoptotische cellen nemen reeds veel 7AAD op [44]. Gegevens over de levende $CD8^+7AAD^-$ T-cellen werden verkregen door een eerste *gate* op de levende lymfocyt populatie te plaatsen en een tweede op de $7AAD^+$ cellen (figuur 7A-B). Tenslotte werd er gekeken naar de $CD8^+$ T-cellen die zich wél in de levende lymfocyt populatie, maar niet in de $7AAD^+$ populatie bevonden (figuur 7C).



Figuur 7: Analyse van de proliferatie van $CD8^+7AAD^-$ T-cellen

(A) levende lymfocyt populatie; (B) $7AAD^+$ apoptotische cellen; (C) cellen die tot de levende lymfocyt populatie maar niet tot de $7AAD^+$ cel populatie horen, aangekleurd met CD8-PE en CFSE.

Tot slot werd de delta prolifererende fractie (ΔPF) berekend van $CD8^+7AAD^-$ T-cellen in de verschillende condities (tabel 5) door de achtergrondproliferatie ($CD8^+$ T-cellen in KM) af te trekken van de prolifererende fractie in respons op de gestimuleerde en bestraalde $CD4^+$ T-

cellen. De SI werd bepaald door de verhouding van PF van CD8⁺7AAD⁻ T-cellen na stimulatie en PF van CD8⁺7AAD⁻ T-cellen in KM. De respons kan als positief beschouwd worden indien ΔPF minstens 1.0% én de SI minstens 2.0 bedraagt [45].

Tabel 6: Opzet van de co-cultuur assay op korte termijn

Conditie	Respondercellen	Stimulus	Extra
1	10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	-	-
2	10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	4x10 ⁴ CD4 ⁺ T-cellen*	-
3	10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	4x10 ⁴ CD4 ⁺ T-cellen*	Anti-MHC klasse I en II
4	2x10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	-	-
5	2x10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	4x10 ⁴ CD4 ⁺ T-cellen*	-
6	2x10 ⁵ CD8 ⁺ T-cellen	4x10 ⁴ CD4 ⁺ T-cellen*	Anti-MHC klasse I en II

* CD4⁺ T-cellen gestimuleerd met CD3D28

2.6.3 Lange termijn co-cultuur (*in vitro* assay)

In de lange termijn co-cultuur werden CD4⁺ T-cellen eveneens geïsoleerd en gestimuleerd zoals beschreven in paragraaf 2.7.1. CD8⁺ T-cellen werden geïsoleerd uit PBMCs zoals aangegeven in paragraaf 2.7.2. Deze co-cultuur assay, of *in vitro*-assay is gelijkaardig aan de generatie van MBP-reactieve T-celklonen (paragraaf 2.6). CD8⁺ T-cellen werden uitgeplaat in 60 wells van een 96-well microtiterplaat met U-bodem aan een densiteit van 4x10⁴ cellen per well en gestimuleerd met vooraf geactiveerde en bestraalde autologe CD4⁺ T-cellen (4x10⁴ cellen/well). Op dag 7 werden de CD8⁺ T-cellen gerestimuleerd met de geactiveerde en bestraalde autologe CD4⁺ T-cellen. Groeipositieve lijnen werden op dag 14 getest via een split-well assay en werd specifieke reactiviteit nagegaan via een ³H-Thymidine incorporatie assay zoals beschreven in paragraaf 2.6. In de split-well assay werd er echter aan twee aliquots vooraf gestimuleerde (24 uur), bestraalde autologe CD4⁺ T-cellen toegevoegd en aan de twee overige aliquots bestraalde autologe PBMC als bron van rustende cellen.

3 Resultaten

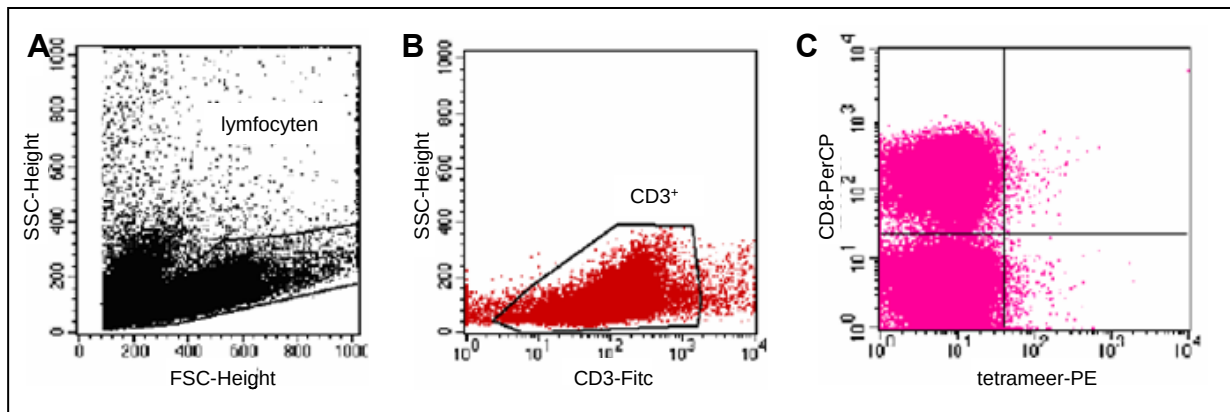
Het hoofddoel van deze stage was het onderzoek naar CD8⁺ regulatoire mechanismen, meer bepaald de rol van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen. Op de eerste plaats werd via een *ex vivo* methode getracht HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen te detecteren. In deze methode wordt gebruik gemaakt van HLA-E tetrameren opgeladen met Qdm, een peptide dat hoge affiniteit vertoont voor HLA-E. In de tweede plaats werd de HLA-E oppervlakte-expressie op verschillende immunologische celtypes bestudeerd en werd de HLA-E expressie nagegaan op verschillende tijdstippen na activatie. De oppervlakte-expressie werd nagegaan met behulp van flow cytometrie, de HLA-E expressie op mRNA-niveau werd bestudeerd via Real-Time PCR. In een derde onderdeel van de stageperiode werd de reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen bepaald via een co-cultuur systeem. Specifieke CD8⁺ T-celproliferatie werd enerzijds nagegaan met behulp van een CFSE-assay en anderzijds via een *in vitro limiting dilution assay* (LDA).

3.1 Aankleuring van PBMC met HLA-E /Qdm tetrameren

Eerst werd nagegaan of we met behulp van HLA-E/Qdm tetrameren HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen kunnen detecteren. Hiervoor werden PBMC van vier gezonde controles (GC) en twee MS-patiënten (MS) geïsoleerd met behulp van een Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie en vervolgens aangekleurd met CD8-PerCP, CD3-FITC en HLA-E tetrameer-PE. Via flow cytometrie werd bepaald welk percentage CD8⁺ T-cellen interageren met de HLA-E/Qdm tetrameren. Een eerste *gate* werd geplaatst op de levende lymfocytpopulatie, een tweede *gate* op de CD3⁺ celpopulatie, respectievelijk figuur 8A en B. Figuur 8C toont de CD8⁺ T-cellen die zowel tot de lymfocyt *gate* als tot de CD3⁺ populatie behoren. Tabel 7 toont dat voor 5 gezonde controles er een klein percentage CD8⁺ T-cellen ($3.92\% \pm 3.05$) interageert met de HLA-E tetrameren. Ook bij de twee geteste MS-patiënten konden kleine percentages interagerende CD8⁺ T-cellen aangetoond worden ($4.10\% \pm 2.14$). Er zijn geen verschillen tussen de twee populatiegroepen.

Om na te gaan of deze HLA-E/Qdm tetrameren interageerden met de CD94/NKG2A receptor of de TCR $\alpha\beta$ op de CD8⁺ T-cellen, werden de cellen geïncubeerd met enerzijds een antilichaam gericht tegen de CD94/NKG2A receptor en anderzijds een antilichaam tegen de TCR $\alpha\beta$. Stalen werden vervolgens aangekleurd met anti-CD3-FITC, anti-CD8-PerCP en HLA-E/Qdm tetrameer-PE. De interactie tussen de CD8⁺ T-cellen en de HLA-E/Qdm

tetrameren bij 5 gezonde controles en twee MS-patiënten werd in beide populatiegroepen volledige geïnhibeerd indien de CD94/NKG2A receptor geblokt werd (tabel 7). Bij incubatie met het antilichaam gericht tegen de TCR $\alpha\beta$ in een gezonde controle en een MS-patiënt, kon er waargenomen worden dat de interactie tussen de CD8⁺ T-cellen en de HLA-E/Qdm tetrameren niet verdwijnt. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur 9.



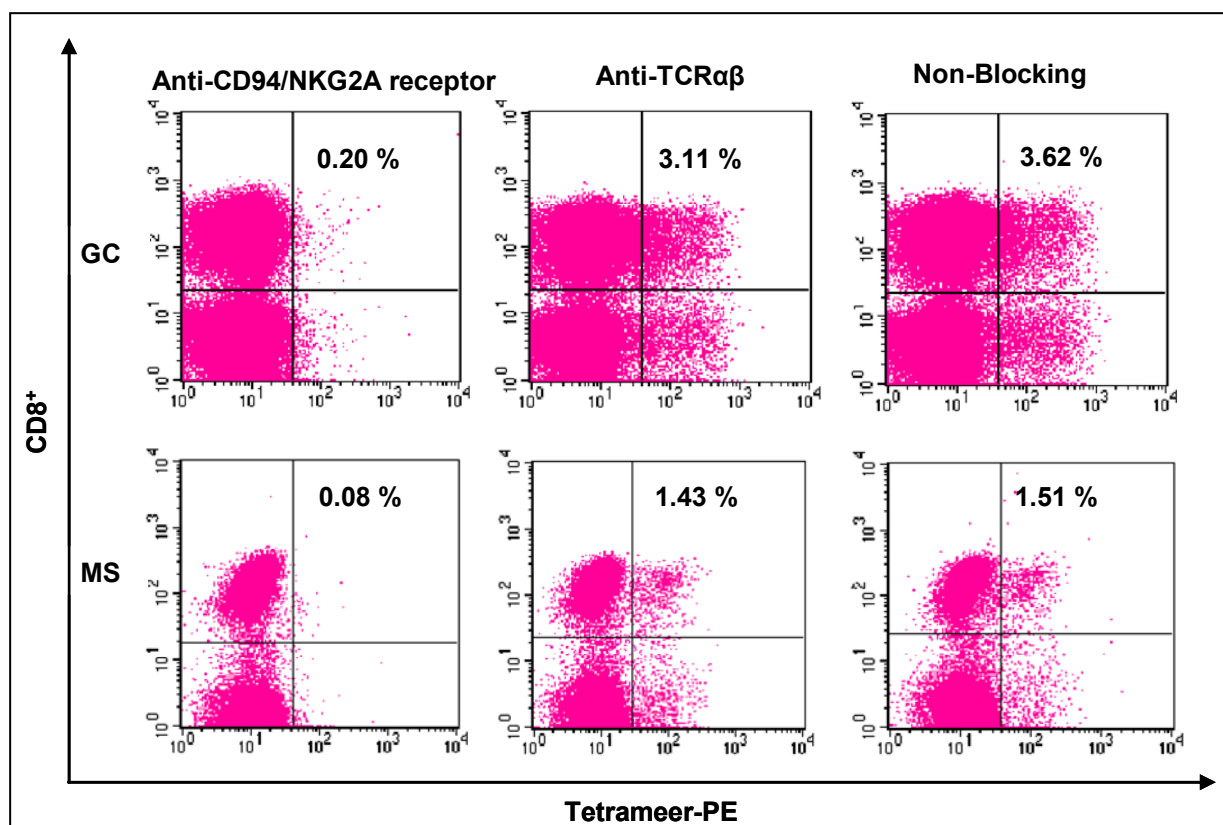
Figuur 8: Analyse van CD8⁺ T-cellen die interageren met de HLA-E/Qdm tetrameren

(A) levende lymfoctytpopulatie; (B) CD3⁺ gate; (C) cellen die zowel tot de lymfoctytpopulatie horen als CD3⁺ zijn, aangekleurd voor CD8-PerCP en tetrameer-PE.

Tabel 7: Percentage van CD8⁺ T-cellen die interageren met de HLA-E tetrameren

	Geen blocking van CD94/NKG2A receptor	Blocking van CD94/NKG2A receptor
GC		
1	2.83%	0.03%
2	0.92%	0.12%
3	1.70%	0.05%
4	4.66%	0.04%
5	9.47%	0.49%
MS		
1	6.24%	0.32%
2	1.96%	0.13%

Uit deze experimenten kon er geconcludeerd worden dat het mogelijk is om met behulp van HLA-E/Qdm tetrameren HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen te detecteren. Deze interactie gebeurt echter met de CD94/NKG2A receptor en niet met de TCR $\alpha\beta$. In de toekomst zal er gebruik gemaakt worden van HLA-E tetrameren die opgeladen zijn met andere peptiden die vermoedelijk wel een interactie vertonen met de TCR $\alpha\beta$ op de CD8⁺ T-cellen.



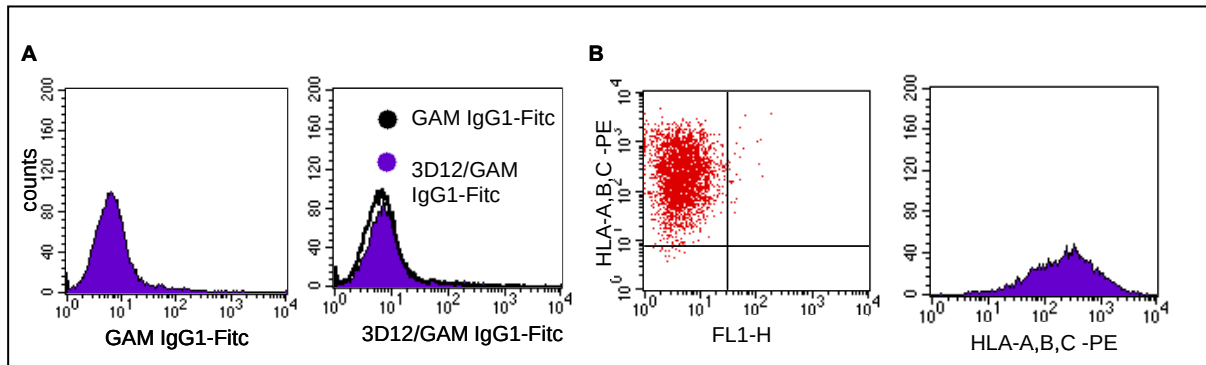
Figuur 9: Interactie tussen CD8⁺ T-cellen en HLA-E/Qdm tetrameren

Om na te gaan hoe HLA-E/Qdm tetrameren binden met CD8⁺ T-cellen, werd enerzijds de TCRαβ en anderzijds de CD94/NKG2A receptor op PBMC geblokt alvorens de CD8⁺ T-cellen aangekleurd werden met HLA-E/Qdm tetrameren. De percentages in iedere plot geeft telkens het percentage CD8⁺ T-cellen weer die binden met de HLA-E/Qdm tetrameren. Deze figuur is een representatieve voorstelling voor één gezonde controle en één MS-patiënt.

3.2 HLA-E expressie op het celoppervlak van verschillende immunologische celtypen

Om na te gaan of HLA-E expressie exclusief plaatsvindt op het celoppervlak van T-cellen of ook op het oppervlak van andere immunologische celtypen, werd de HLA-E expressie op het celoppervlak van T-cellen, B-cellen en NK-cellen nagegaan. Vooraleer de HLA-E expressie op het celoppervlak van verschillende immunologische subpopulaties bepaald werd, werd de kruisreactiviteit getest van het beschikbare anti-HLA-E (3D12) antilichaam met klassieke MHC klasse Ia moleculen, meer specifiek HLA-A, B en C. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een controle-celijn: de kankercelijn CACO-2. Een eerste test toonde aan dat deze cellijn negatief was voor HLA-E aangezien aankleuring met 3D12/GAM IgG1-FITC leidde tot een *mean fluorescence intensity* (MFI) van 12.4 dat niet significant verschillend is van de MFI (10.3) na aankleuring met enkel het secundair antilichaam. Dit is aangegeven voor de CACO-2 cellijn in figuur 10A. Parallel aan deze kleuring werd de CACO-2 cellijn aangekleurd met antilichamen gericht tegen HLA-A, B en C. Resultaten van dit experiment zijn weergegeven

in figuur 10B. Uit beide experimenten blijkt dat het HLA-E antilichaam (3D12) geen kruisreactiviteit vertoont met HLA-A, B en C, aangezien de cellijn 100% positief is voor HLA-A,B en C (MFI= 375.7) terwijl de cellijn negatief blijkt te zijn voor HLA-E (MFI=12.4).

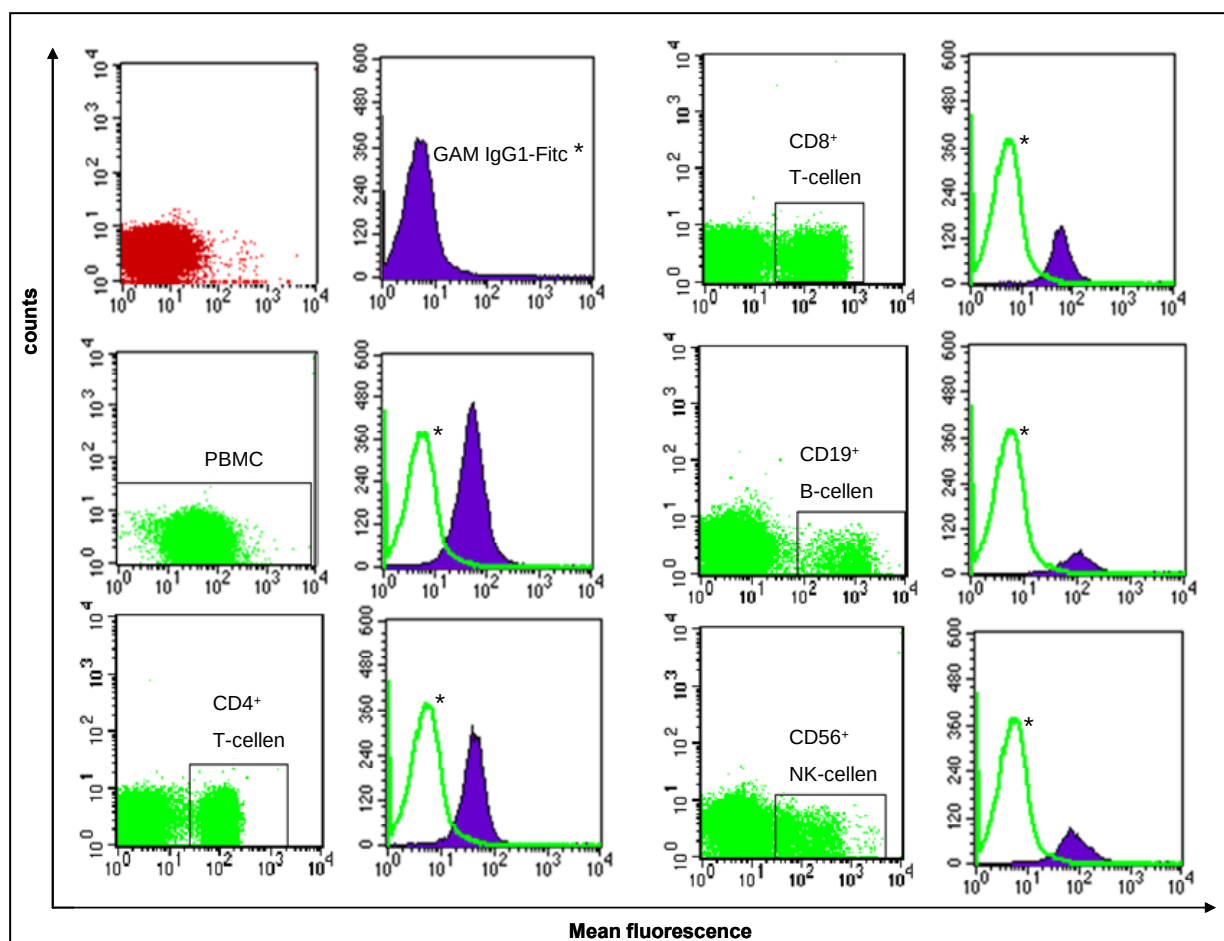


Figuur 10: Analyse van de kruisreactiviteit van 3D12 met HLA-A, B en C

De kruisreactiviteit van het HLA-E antilichaam werd getest op een CACO-2 cellijn. (A) Kleuring met enkel het FITC-gelabelde secundaire antilichaam geeft een MFI van 10.3 , de combinatiekleuring met het primaire antilichaam 3D12 geeft een MFI van 12.4 . (B) Een tweede kleuring met antilichamen gericht tegen klassieke HLA klasse Ia moleculen, HLA-A,B,C. Kwadrant I toont aan dat de CACO-2 cellijn 100% positief is voor deze moleculen, er was een MFI van 375.7.

Analyse van de HLA-E expressie op het celoppervlak van verschillende immunologische celtypes werd nagegaan met behulp van flow cytometrische analyse. PBMC van één gezonde donor werden geïncubeerd met antilichamen gericht tegen oppervlakte markers van T-helper-cellen (CD4), cytotoxische T-cellen (CD8), B-cellen (CD19) of Natural Killer cellen (CD56) in combinatie met het primair antilichaam 3D12 (anti-HLA-E) en het secundair antilichaam GAM IgG1-FITC. De achtergrondkleuring van het secundair antilichaam werd nagegaan door de PBMC aan te kleuren met enkel het secundair FITC-gelabelde antilichaam. Figuur 11 toont aan dat HLA-E tot expressie komt op het celoppervlak van alle immunologische celtypes die onderzocht werden. Een hoogste oppervlakte-expressie werd waargenomen op de B-cellen (MFI = 128.6), gevolgd door de NK-cellen (MFI = 93.6), $CD8^+$ T-cellen (MFI = 74.2) en $CD4^+$ T-cellen (MFI = 45.6).

Hieruit blijkt dat HLA-E op het celoppervlak van alle bestudeerde rustende immunologische celtypes tot expressie komt. Verder onderzoek moet nog uitwijzen of dit expressiepatroon ook op mRNA-niveau te detecteren is.

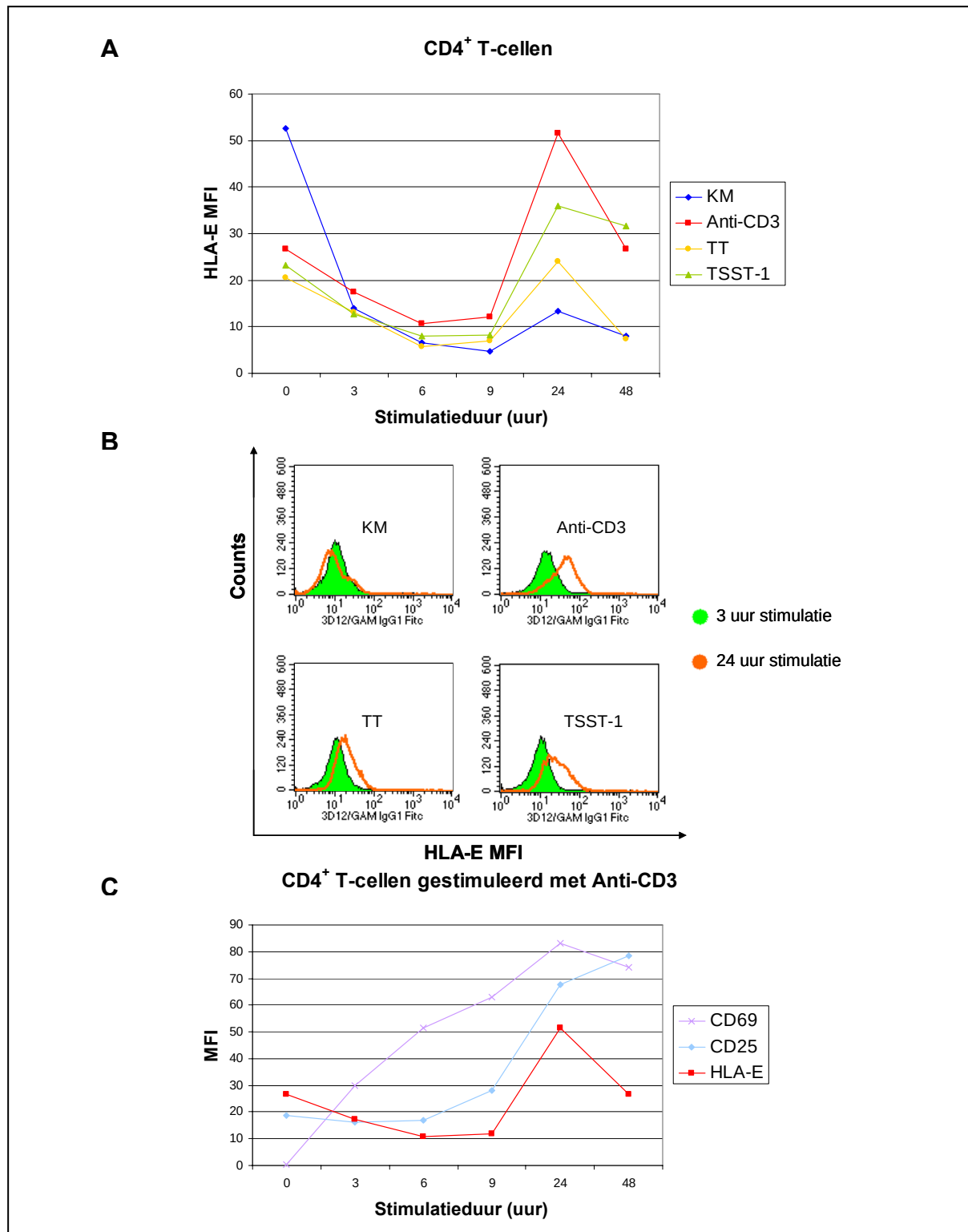


Figuur 11: HLA-E oppervlakte-expressie op verschillende immuunsubpopulaties

Om de oppervlakte-expressie van HLA-E na te gaan op de verschillende immunologische celtypen werden PBMC aangekleurd met antilichamen tegen oppervlaktemerkers $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ of $CD56^+$ cellen in combinatie met het primaire HLA-E antilichaam en het secundair GAM IgG1-FITC antilichaam. Een eerste gate werd geplaatst op de levende lymfocytpopulatie, een tweede op de gewenste immunologische celpopulatie zoals weergegeven in de verschillende dotplots. Cellen positief voor HLA-E in deze verschillende subpopulaties werden telkens weergegeven in een histogram met een *overlay* van de aankleuring met enkel het secundair antilichaam.

3.3 Invloed van activatie op HLA-E oppervlakte-expressie

Na bepaling van de oppervlakte-expressie werd vervolgens nagegaan of de HLA-E expressie opgereguleerd wordt na activatie. Voor dit experiment werden PBMC van één gezonde controle gestimuleerd met TT, TSST-1 of anti-CD3. Als negatieve controle werden de PBMC in KM opgegroeid zonder stimulus. De cellen werden in een 24-well microtiterplaat gestimuleerd aan een concentratie van 2×10^6 cellen/well gedurende verschillende tijdspannes. Bij een eerste experiment werd de HLA-E expressie op het celoppervlak nagegaan met behulp van flowcytometrie na 3, 6, 9, 24 en 48 uur stimulatie. Voor de FACS kleuring werden de cellen geïncubeerd met antilichamen gericht tegen activatiemerkers CD69-PE of CD25-PE en

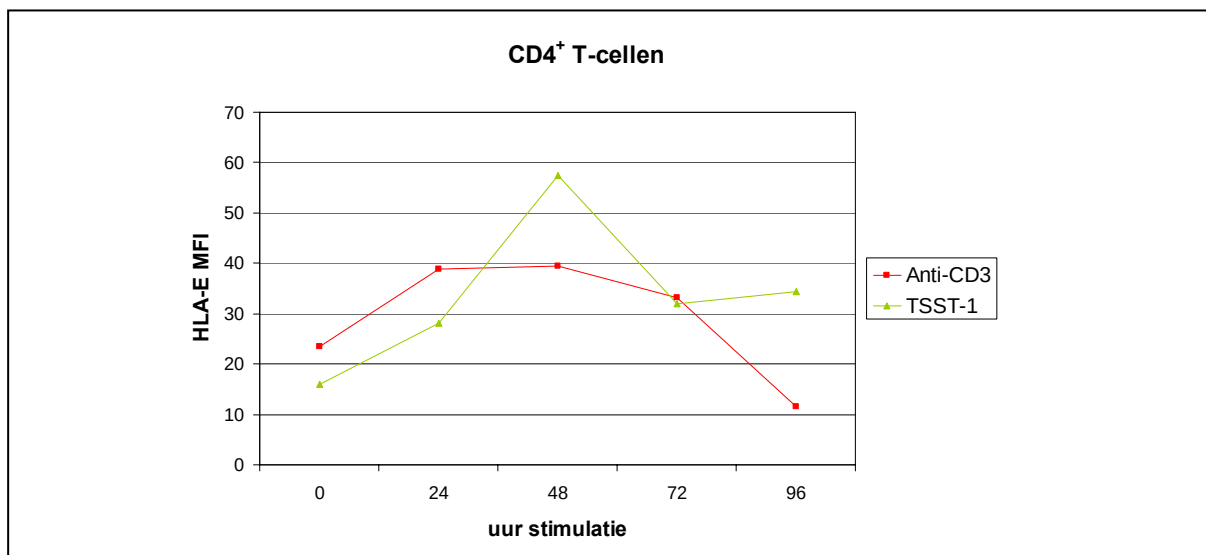


Figuur 12: HLA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen na verschillende stimulatietijden

(A) De HLA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen werd na 3, 6, 9, 24 en 48 uur stimulatie met KM, anti-CD3, TT en TSST-1 bepaald. (B) Histogramplots van de negatieve controle of condities met de verschillende stimuli met een overlay van 3 uur stimulatie (groen) met 24 uur stimulatie (oranje). (C) Oppervlakte-expressie van activatiemerkers CD69 en CD25 en HLA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen gestimuleerd met anti-CD3.

de oppervlaktemerker van CD4⁺ T-cellen, in combinatie met het primair antilichaam 3D12 en het secundair antilichaam GAM IgG1-FITC.

Figuur 12 toont het resultaat van het kinetiek-experiment voor één gezonde controle. Hieruit blijkt dat er na 3 uur eerst een downregulatie van HLA-E expressie plaatsvindt. Dit was zowel te zien op CD4⁺ T-celniveau als op PBMC niveau (data niet weergegeven) en in de condities met zowel de specifieke stimuli als bij de negatieve controle opgekweekt in KM. Gedurende de tijdsperiode van 3 tot en met 9 uur werd geen verandering in oppervlakte-expressie waargenomen in de verschillende condities. Verder kan uit figuur 12 waargenomen worden dat de cellen die opgekweekt werden met TT, TSST-1 of anti-CD3 na 24 uur een opregulatie van HLA-E oppervlakte-expressie vertoonden. Deze opregulatie vond niet plaats in de niet gestimuleerde controle (KM) en was het sterkst bij de stimuli TSST-1 en anti-CD3 en minder uitgesproken voor TT. Er werd opnieuw een afname van HLA-E oppervlakte-expressie waargenomen na 48 uur. In figuur 12C wordt aangetoond dat de CD4⁺ T-cellen geactiveerd zijn, dit door de vroege activatiemerker CD69 en de latere activatiemerker CD25. Hieruit blijkt ook dat HLA-E oppervlakte-expressie eenzelfde verloop vertoont als die van de merker CD25. Hieruit kunnen we besluiten dat HLA-E niet in de eerste vroege activatieperiode op het celoppervlak tot expressie komt.



Figuur 13: HLA-E oppervlakte-expressie op CD4⁺ T-cellen na lange stimulatietijden

De HLA-E oppervlakte-expressie werd nagegaan op CD4⁺ T-cellen na 24, 48, 72 en 96 uur stimulatie met TSST-1 en anti-CD3.

Om te verifiëren dat de HLA-E oppervlakte-expressie afnam na 48 uur stimulatie, werd er gekozen om een nieuw experiment op te zetten met langere stimulatietijden. Hiervoor werden PBMC van één gezonde donor gedurende 24, 48, 72 en 96 uur gestimuleerd met TSST-1 of

anti-CD3. Deze data, weergegeven in figuur 13, tonen een gelijkaardige opregulatie van HLA-E na 24 uur voor anti-CD3, waarna deze in een plateaufase komt tot 72 uur, om vervolgens weer af te nemen. Indien de PBMC gestimuleerd werden met TSST-1 werd een opregulatie in HLA-E oppervlakte-expressie waargenomen vanaf 24 uur, deze opregulatie hield stand tot 48 uur, waarna vervolgens de HLA-E oppervlakte-expressie afnam.

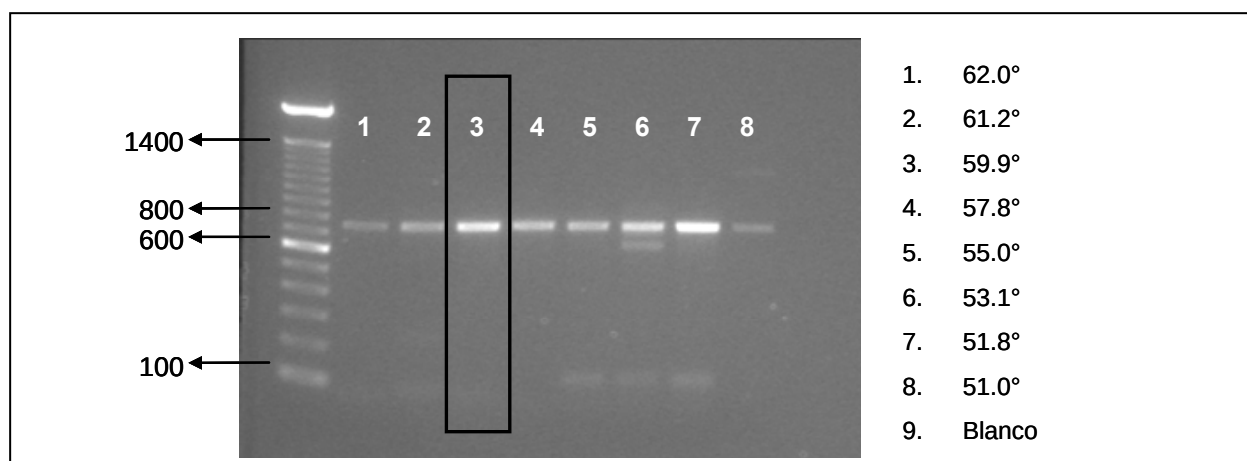
Uit deze experimenten kunnen we besluiten dat HLA-E oppervlakte-expressie opgereguleerd wordt na activatie met verschillende stimuli. Indien PBMC gestimuleerd worden met TSST-1 is de HLA-E oppervlakte-expressie op de CD4⁺ T-cellen maximaal na 48 uur stimulatie. PBMC gestimuleerd met anti-CD3 vertonen een maximale HLA-E oppervlakte-expressie na 24 uur stimulatie.

3.4 HLA-E expressie op mRNA-niveau

Om na te gaan of eenzelfde expressiepatroon kon gedetecteerd worden op mRNA-niveau, werd met behulp van *Real Time* PCR, analyses van de bovengenoemde stalen uitgevoerd. Eerst diende hiervoor een PCR-reactie geoptimaliseerd te worden gebruik makend van HLA-E specifieke primers om vervolgens de sequentie te verifiëren met behulp van sequentie PCR. Als laatste stap werd de RT-PCR-reactie geoptimaliseerd om vervolgens de analyse van HLA-E expressie op mRNA-niveau uit te voeren.

3.4.1 Optimalisatie PCR-reactie

Aan de hand van de HLA-E sequentie en met behulp van het computerprogramma Oligo6 werden specifieke primerparen ontworpen en werd de PCR-reactie in eerste instantie geoptimaliseerd voor dit primerpaar erop lettend dat beide HLA-E-varianten geamplificeerd werden. De optimale annealingstemperatuur werd bepaald via een temperatuurgradiënt-PCR op cDNA uit PBMC van een gezonde controle die gecontroleerd werd op een 1% agarose gel, weergegeven in figuur 14. Er werd een gradiënt voor de annealingstemperatuur genomen van 51.0°C over 51.8°C, 53.1°C, 55.0°C, 57.8°C, 59.9°C, 61.2°C tot en met 62.0°C. De optimale annealings-temperatuur bleek 59.9°C. Deze temperatuur gaf de hoogste opbrengst voor een PCR-fragment dat overeenkomt met de geschatte lengte voor HLA-E (741 baseparen) zonder het optreden van aspecifieke bijproducten of vorming van primer-dimeren.

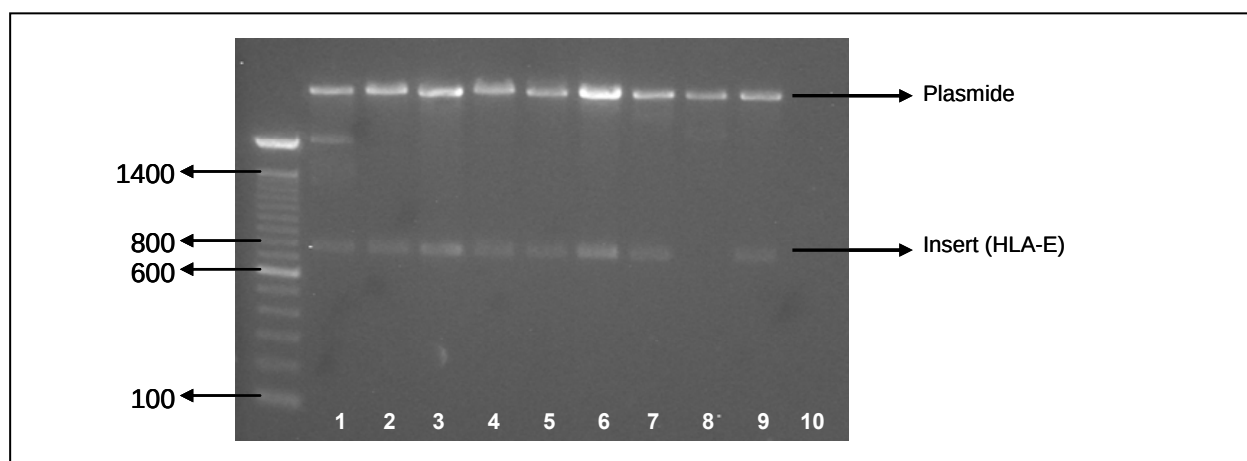


Figuur 14: Optimalisatie annealingstemperatuur voor HLA-E primers

De optimale annealingstemperatuur voor het HLA-E primerpaar werd bepaald met behulp van een gradiënt-PCR. Elke annealingstemperatuur gaf een product van de juiste lengte (circa 741 basenparen). Een annealingstemperatuur van 59.9°C (kader) kon als optimaal beschouwd worden.

3.4.2 HLA-E klonering in een TOPO-TA vector

Om te verifiëren dat het gevormde PCR-product effectief HLA-E betrof en voor het creëren van de standaardcurve, nodig voor de RT-PCR, werd het PCR-product gekloneerd in een TOPO-TA PCR2.1 vector. Positieve transformaten werden geïdentificeerd op basis van restrictie digestie met EcoRI op opgezuiverd plasmide-DNA. Alle geanalyseerde plasmidebereidingen, uitgezonderd bereiding 8, gaven duidelijk aan dat de ligatie geslaagd was, aangezien er een insert van de verwachte lengte (741 baseparen) te zien is. Laan 10 was de blanco (geen contaminatie).



Figuur 15: Restrictie digestie met EcoRI na TOPO-TA klonering

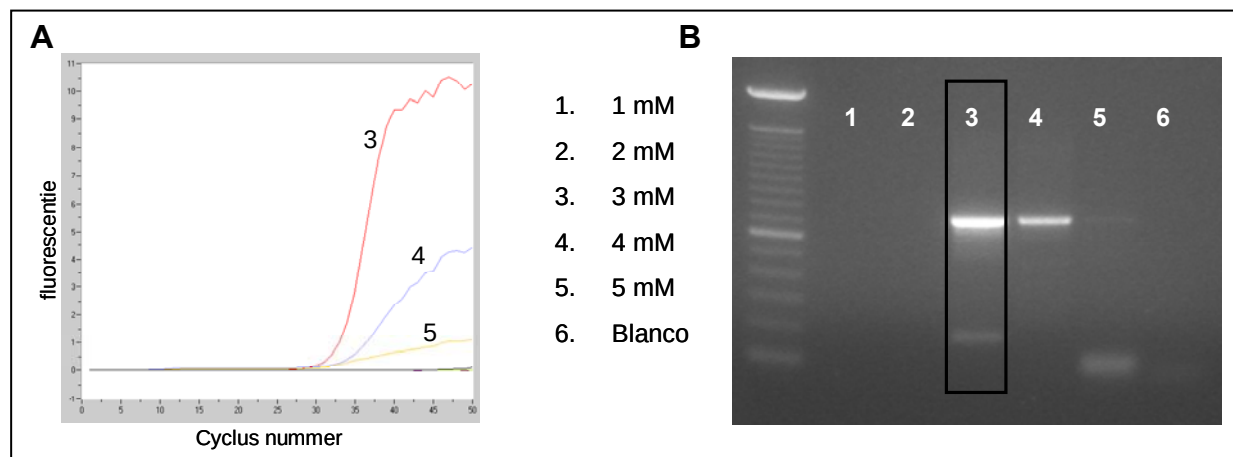
Het PCR-product dat eerder verkregen werd, werd gekloneerd in een TOPO-TA vector die vervolgens met behulp van restrictie digestie met EcoRI gesplitst werd. Het insert heeft een berekende lengte van circa 741 basenparen, wat overeen komt met het HLA-E product dat gevormd werd door het specifieke primerpaar.

De juistheid van het gekloneerde DNA uit plasmide 7 (figuur 15) werd achterhaald met behulp van een sequentie-PCR. Uit analyse bleek de bekomen mRNAsequentie overeen te komen met de HLA-E variant die een glycine heeft op positie 107.

3.4.3 Optimalisatie Real-Time PCR

Om een kwantitatieve bepaling van HLA-E op mRNA-niveau te kunnen realiseren, werd een Real-Time PCR reactie geoptimaliseerd met behulp van de Light Cycler.

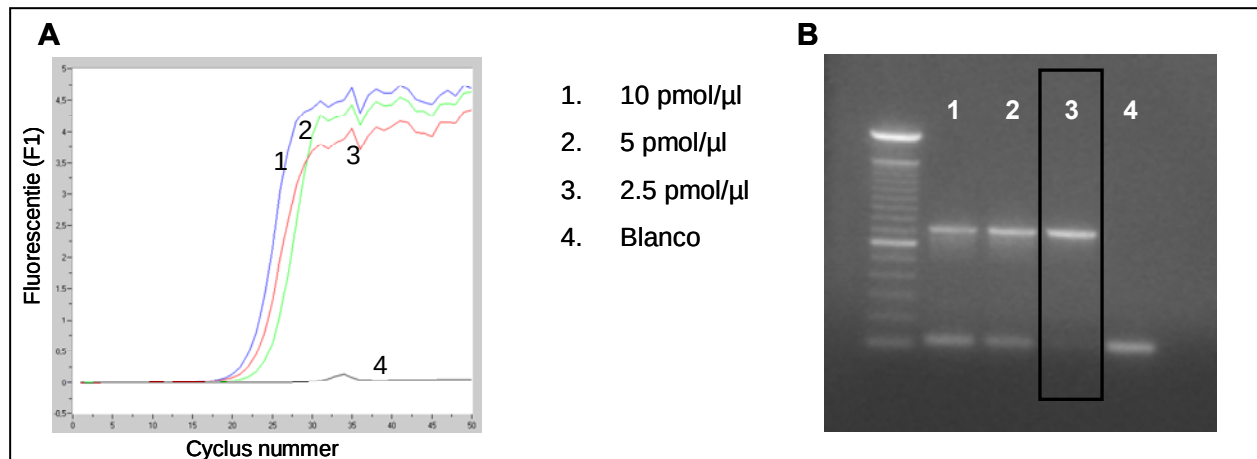
Op de eerste plaats werd de $MgCl_2$ -concentratie geoptimaliseerd gebruik makend van PBMC van gezonde controles. Rekening houdend met de 1mM $MgCl_2$ reeds aanwezig in het *SyberGreen*, werden 5 verschillende reactiemengsels met een verschillende $MgCl_2$ -concentratie toegepast (1, 2, 3, 4 en 5mM). Figuur 16A toont hiervan het resultaat, waaruit blijkt dat de 3mM $MgCl_2$ concentratie leidde tot het beste resultaat (de hoogste opbrengst), wat ook geverifieerd werd na controle op een 1% agarosegel (figuur 16B).



Figuur 16: Optimalisatie $MgCl_2$ concentratie voor de RT-PCR

Er werden 5 verschillende reactiemengsels opgezet met elk een verschillende $MgCl_2$ concentratie. (A) Output van de Light Cycler, waaruit blijkt dat 3mM gevolgd door 4 en 5 mM $MgCl_2$ een product oplevert. 1 en 2 mM geven geen product, deze concentratie is te laag. (B) Hetzelfde resultaat wordt weergegeven op een 1% agarosegel.

Eenmaal de optimale $MgCl_2$ concentratie gekend was, werd de optimale primerconcentratie bepaald. Hiervoor werden drie reactiemengsels aangemaakt met een $MgCl_2$ concentratie van 3mM en primerconcentraties van respectievelijk 2.5, 5.0 en 10.0 pmol/ μ l. De analyse uitgevoerd met behulp van de Light Cycler wordt weergegeven in figuur 17. Hieruit bleek dat elke primerconcentratie een product opleverde. 2.5pmol/ μ l kan aanzien worden als de optimale primerconcentratie omdat bij deze concentratie het minst primer-dimeren gevormd werden zoals te zien in figuur 17B op de 1% agarosegel en op de smeltcurve gegenereerd door de Light Cycler (data niet weergegeven).



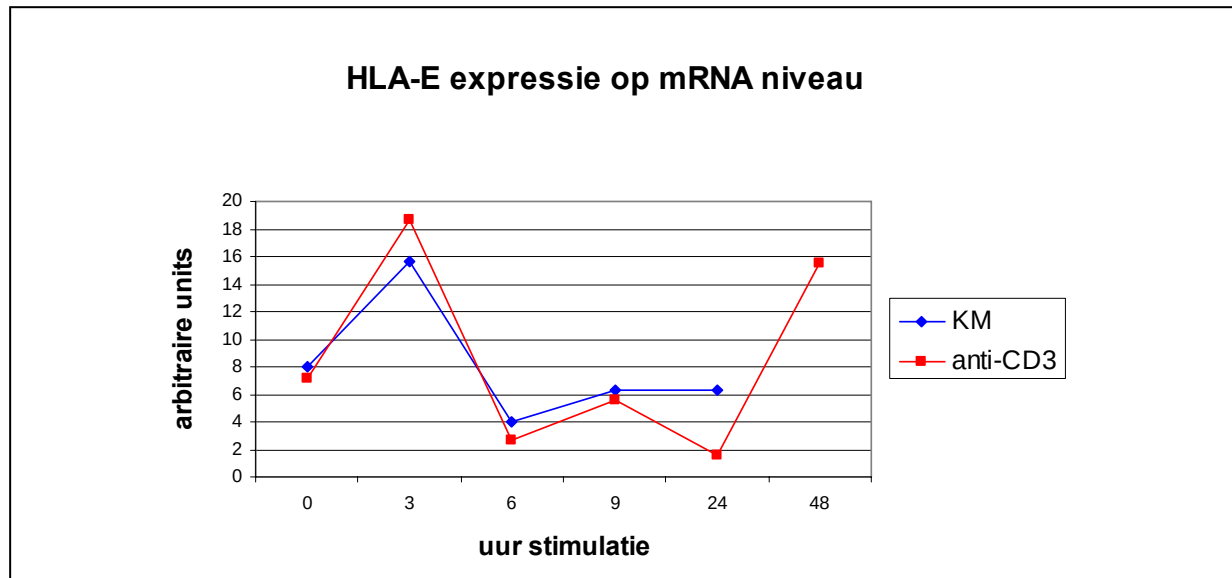
Figuur 17: Optimalisatie primer concentratie voor de RT-PCR

Er werden 3 verschillende reactiemengsels opgezet met elk 3 mM MgCl_2 en een primerconcentratie van 2.5, 5.0 of 10.0 pmol/ μl . (A) de output van de Light Cycler geeft een gelijkaardig resultaat voor de drie verschillende concentraties. (B) Na controle op 1% agarosegel blijkt dat een primerconcentratie van 2.5pmol/ μl optimaal is aangezien deze concentratie het minst primer-dimeren genereert. De blanco is niet gecontamineerd, maar aangezien hier geen staal aanwezig is, worden primer-dimeren gevormd.

3.4.4 Invloed van activatie op HLA-E mRNA expressie

Na optimalisatie van de RT-PCR-reactie kon de HLA-E expressie op mRNA-niveau nagegaan worden. De PBMC van één gezonde controle na 0, 3, 6, 9 en 24 uur stimulatie met anti-CD3 of KM (zonder stimulus) werden geanalyseerd. De verschillende hoeveelheden cDNA in ieder staal werden genormaliseerd door de verhouding te nemen van de concentratie van het HLA-E gen en de concentratie van het GAPDH huishoudgen in eenzelfde staal, uitgedrukt in arbitraire units ($\text{AU} = [\text{HLA (ng/ml)}]/[\text{GAPDH ng/ml}]$). Initiële resultaten, weergegeven in figuur 18 tonen aan dat de HLA-E expressie op mRNA-niveau stijgt na 3 uur activatie in zowel het staal met als zonder stimulus. Na een daaropvolgende daling is het HLA-E mRNA-expressie niveau stabiel. Indien er geactiveerd werd met anti-CD3, werd een tweede opregulatie in mRNA-niveau waargenomen na 48 uur. Deze initiële resultaten staan in contrast met de bevindingen van HLA-E expressie op het celoppervlak. Verdere experimenten zijn nog vereist om deze resultaten te vervolledigen.

Er werd ook gekeken naar de HLA-E expressie op mRNA-niveau van de MCF-7 cellijn. In deze cellijn werd HLA-E terug gevonden, wat erop wijst dat in deze cellijn HLA-E wél tot expressie komt op mRNA-niveau maar niet op eiwit-niveau op het celoppervlak.



Figuur 18: HLA-E expressie op mRNA niveau

HLA-E expressie op mRNA/cDNA-niveau in elke staal na 0 tot 48 uur stimulatie genormaliseerd voor de hoeveelheid DNA aanwezig in het staal met behulp van de GAPDH concentratie aanwezig in hetzelfde staal.

*Er werd geen staal meegenomen in de analyse van de negatieve controle bij 48 uur stimulatie

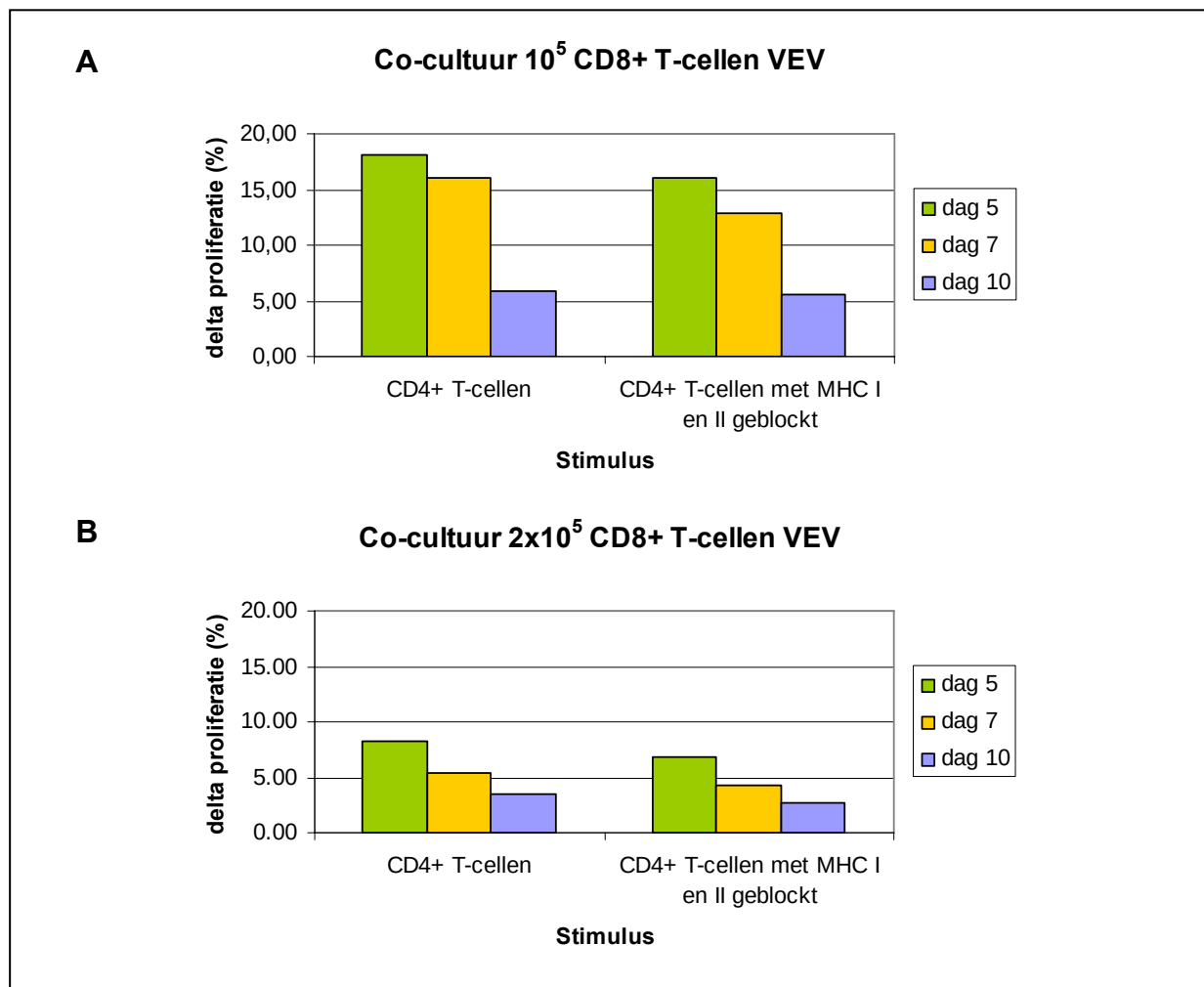
3.5 Reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van CD4⁺ T-cellen in een co-cultuur

Om de reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4⁺ T-cellen na te gaan, werd gebruik gemaakt van een co-cultuursysteem van CD8⁺ en bestraalde HLA-E⁺CD4⁺ T-cellen geïsoleerd uit PBMC van 2 gezonde individuen. Enerzijds werd gebruik gemaakt van een korte co-cultuur waarin de CD8⁺ T-cellen gelabeld werden met CFSE, anderzijds werd er ook gebruik gemaakt van een lange co-cultuur, een *in vitro* assay, om de reactiviteit van de CD8⁺ T-cellen na te gaan.

3.5.1 CFSE-assay

In de eerste plaats werden CD4⁺ T-cellen geïsoleerd uit PBMC met behulp van RosetteSep en werden ze geactiveerd met CD3CD28 dynabeads gedurende 24 uur om een maximale HLA-E expressie-niveau te bekomen (zie resultaten 3.3). Autologe CD8⁺ T-cellen werden vervolgens geïsoleerd uit PBMC via negatieve isolatie met dynabeads en gelabeld met CFSE. Een co-cultuur systeem werd opgesteld zoals beschreven in tabel 5. Specifieke CD8⁺ T-celproliferatie na 5, 7 en 10 dagen werd geanalyseerd door middel van het meten van het CFSE-sigitaal op deze verschillende tijdstippen. Hiervoor werden de culturen aangekleurd met CD8-PE om de CD8⁺ T-celpopulatie te detecteren en werd een 7AAD kleuring toegepast om apoptotische cellen te excluderen.

De achtergrondproliferatie (KM) van $CD8^{+}7AAD^{-}$ T-cellen was laag: 0.12%, 0.09% en 0.04% op respectievelijk dag 5, 7 en 10. Na stimulatie van de $CD8^{+}$ T-cellen met geactiveerde en bestraalde $CD4^{+}$ T-cellen vertoonden de $CD8^{+}$ T-cellen een positieve proliferatieve respons ($\Delta PF > 1\%$ en $SI > 2$) op alle tijdstippen, weergegeven in figuur 19. De sterkste proliferatie werd waargenomen in de co-culturen met 10^5 $CD8^{+}$ T-cellen (figuur 19A), hetzelfde beeld werd waargenomen in de co-culturen met 2×10^5 $CD8^{+}$ T-cellen, maar minder uitgesproken (figuur 19B). De proliferatieve respons van de $CD8^{+}$ T-cellen nam af naarmate zij een langere tijd (5, 7 en 10 dagen) gestimuleerd werden met geactiveerde $CD4^{+}$ T-cellen



Figuur 19: ΔPF van de $CD8^{+}7AAD^{-}$ T-cellen in een co-cultuur van $CD8^{+}$ en $CD4^{+}$ T-cellen

CFSE gelabelde $CD8^{+}$ T-cellen werden gedurende 5, 7 en 10 dagen gestimuleerd met geactiveerde, bestraalde en eventueel geblokkeerde $CD4^{+}$ T-cellen. De berekende ΔPF is uitgezet op de Y-as, de X-as geeft de verschillende stimuli weer. (A) Co-cultuur van 10^5 $CD8^{+}$ T-cellen en 4×10^4 $CD4^{+}$ T-cellen (B) Co-cultuur van 2×10^5 $CD8^{+}$ T-cellen en 4×10^4 $CD4^{+}$ T-cellen.

(figuur 19). Indien in de co-cultuur de MHC klasse I en II moleculen op de CD4⁺ T-cellen geblokt werden, was er in vergelijking met de niet-geblokte co-culturen een gelijkaardige maar licht afgenomen proliferatieve respons van de CD8⁺ T-cellen waargenomen.

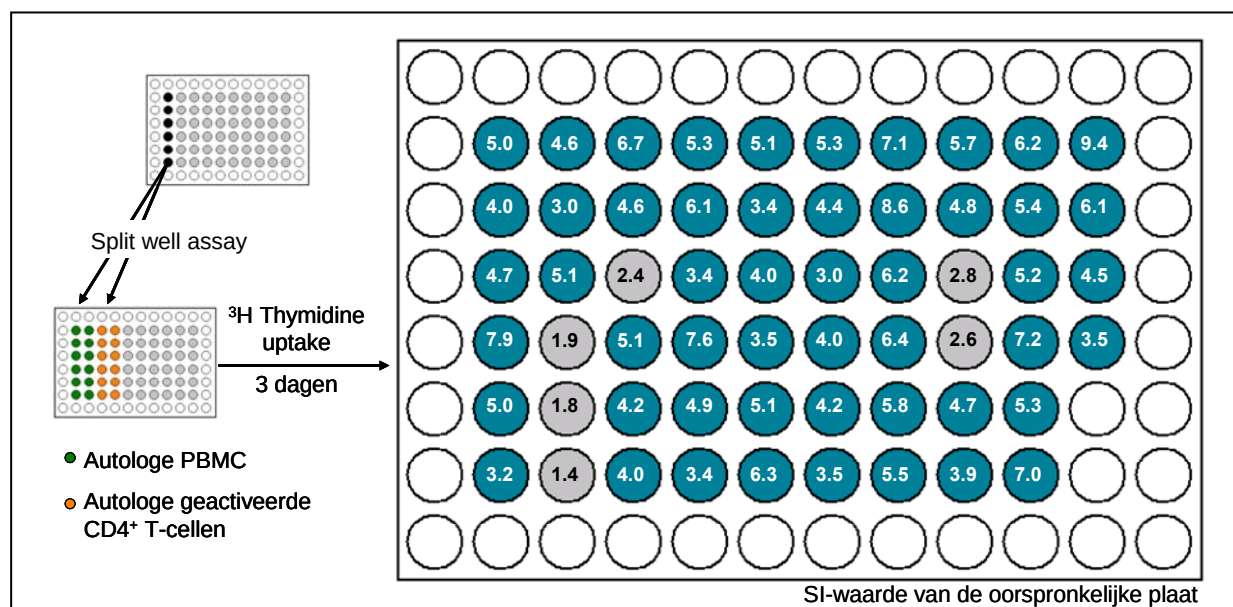
Er werd dus een hoge reactiviteit van de CD8⁺ T-cellen ten opzichte van de CD4⁺ T-cellen waargenomen, verder onderzoek moet nog uitwijzen of deze waargenomen proliferatie van de CD8⁺ T-cellen HLA-E gerestricteerd is.

3.5.2 In vitro assay

Ook op lange termijn werd de reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van CD4⁺ T-cellen nagegaan met behulp van een co-cultuursysteem voor 2 gezonde individuen zals beschreven in paragraaf 2.6.

De berekende SI-waarden van één gezonde controle wordt weergegeven in figuur 20, de resultaten van de andere gezonde controle was gelijkaardig. Praktisch alle wells hadden een positieve SI (SI ≥ 3), 90% van de CD8⁺ T-cellen prolifererden in respons op de gestimuleerde CD4⁺ T-cellen.

IN overeenstemming met de korte co-cultuur werd dus opnieuw een hoge reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen waargenomen. Verder onderzoek zal nog moeten uitwijzen of deze reactiviteit van de CD8⁺ T-cellen gerestricteerd is door HLA-E.



Figuur 20: SI-waarden van de co-cultuur van 4×10^4 CD8⁺ en 4×10^4 CD4⁺ T-cellen

Geïsoleerde CD8⁺ T-cellen werden gedurende 14 dagen gestimuleerd met geïsoleerde, geactiveerde en bestraalde CD4⁺ T-cellen. Specifieke proliferatie werd op dag 14 nagegaan met behulp van een ³H-Thymidine incorporatie-assay. De SI-waarde van elke well is hier weergegeven. Enkel de in het grijs aangegeven wells waren negatief. De anderen kenden een positieve proliferatierespons ≥ 3.

Volgens de huidige hypothese spelen auto-immune T-cellen een belangrijke rol in de pathogenese van MS. Autoreactieve T-cellen komen echter ook voor bij gezonde individuen, maar worden vermoedelijk onderdrukt door verschillende regulatoire netwerken. Eén van die regulatoire netwerken omvat $CD8^+$ T-cellen. Uit diermodelstudies is gebleken dat het onderdrukkend mechanisme van deze $CD8^+$ T-regs functioneert door middel van presentatie van TCR-peptiden van de autoreactieve T-cellen via Qa-1, de murine homoloog van HLA-E [16,34,35]. De rol van HLA-E in MS is echter nog ongekend. Het doel van deze stage was de rol van HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen in gezonde individuen en MS-patiënten te ontrafelen en deze cellen te karakteriseren.

In eerste instantie werd getracht om HLA-E positieve $CD8^+$ T-cellen te detecteren met behulp van een *ex vivo* assay. Met behulp van HLA-E tetrameren, opgeladen met Qdm, werden $CD8^+$ T-cellen gedetecteerd die HLA-E gerestricteerd zijn. Qdm is een MHC klasse Ia afgeleid peptide dat gepresenteerd kan worden via HLA-E. In dit experiment werden 1 tot 5% van de $CD8^+$ T-cellen positief bevonden voor een interactie met HLA-E. Indien de CD94/NKG2A receptor geblokt werd met een specifiek antilichaam, werd deze binding zo goed als volledig geïnhibeerd. Indien er daarentegen geblokt werd voor de $TCR\alpha\beta$ op de $CD8^+$ T-cellen, werd deze inhibitie niet waargenomen. Dit geeft aan dat de HLA-E tetrameren opgeladen met Qdm vermoedelijk niet interageren met de TCR maar met de CD94/NKG2A receptor op de $CD8^+$ T-cellen in gezonde controles en MS-patiënten. Bovendien vertoont één MS-patiënt een lager percentage interagerende cellen in vergelijking met een aantal gezonde controles. Dit zou erop kunnen duiden dat de frequentie van HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen lager is in MS-patiënten waardoor de regulatie verstoord is en autoreactieve T-cellen niet voldoende onderdrukt worden. Er kunnen echter geen eenduidige conclusies getrokken worden. Uit de data blijkt immers dat het percentage interagerende $CD8^+$ T-cellen donor-afhankelijk is, aangezien er ook bij de gezonde controles een grote spreiding zit in het percentage HLA-E gerestricteerde $CD8^+$ T-cellen. Naast de donor-afhankelijke resultaten dient ook de kleine *sample size* van slechts 5 gezonde controles en 2 MS-patiënten in rekening gebracht te worden.

Bovendien is het eveneens mogelijk dat er geen kwantitatieve verschillen zijn, maar dat er functionele verschillen plaats vinden in de $CD8^+$ regulatoire T-cellen van gezonde controles

en MS-patiënten. De onderzoeksgroep Venken *et al* heeft deze vaststelling reeds aan kunnen tonen voor een andere subpopulatie van regulatoire T-cellen, met name de CD4⁺CD25⁺ T-cellen. Uit deze experimenten bleek dat er geen significante kwantitatieve verschillen konden gevonden worden wat betreft de frequentie van CD4⁺CD25⁺ T-cellen in gezonde individuen en MS-patiënten, maar dat deze regulatoire cellen minder functioneel zijn in RR-MS-patiënten [46].

De uitgevoerde experimenten toonden aan dat de HLA-E/Qdm tetrameren enkel interageren met de CD94/NKG2A receptor op de CD8⁺ T-cellen en niet met de TCR [35]. Het is echter de interactie met de TCR die van belang is in dit onderzoek. Eerder onderzoek heeft reeds aangetoond dat regulatoire CD8⁺ T-cellen specifiek geactiveerde, autologe CD4⁺ T-cellen kunnen inhiberen via herkenning van Qa-1-autopeptide-complexen op geactiveerde CD4⁺ T-cellen via hun TCR $\alpha\beta$ [14]. Onderzoek van Jiang *et al* heeft aangetoond Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cellen een rol spelen in de regulatie van perifere immuniteit door T-cellen met een intermediaire tot lage affiniteit/aviditeit voor een antigen, te inhiberen. Het blijkt ook dat Qa-1-Qdm-complexen met een hoge affiniteit gebonden zijn en dat deze complexen interageren met de CD94/NKG2A receptor op de CD8⁺ T-cellen. Het is mogelijk dat bij T-cellen met een intermediaire affiniteit voor (auto)peptiden, T-cel activatie leidt tot de expressie van Qa-1-autopeptide-complexen, in competitie met Qdm, die vervolgens interageren met de TCR $\alpha\beta$ op CD8⁺ T-cellen [47].

Het blijkt dus dat deze HLA-E-peptide-complexen ook interageren met de TCR aanwezig op de CD8⁺ T-cellen. De peptiden die binden aan HLA-E zijn in dit geval nonameren met als dominante ankerresidues een Leucine of Methionine op positie 2 en een Leucine op positie 9. Chess *et al* [16] vonden TCR V β 1 peptide SLELGDSAL en TCR V β 2 peptide LLLGPGSGL als mogelijke kandidaat-bindingspeptiden. Uit hun experimenten blijkt ook dat HLA-E, in complex met deze peptiden, de differentiatie van CD8⁺ cytotoxische T-cellen kan induceren op een TCR V β -restricterende wijze. In het belang van dit onderzoek zou het interessant zijn om de tetrameren op te laden met nonapeptiden afkomstig van Hsp60 of de TCR in plaats van met Qdm epitopen. Verder onderzoek zal vervolgens moeten uitwijzen of detectie van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen met HLA-E tetrameren opgeladen met Hsp60-afgeleide peptiden of TCR-afgeleide peptiden mogelijk is en of deze interageren met dezelfde CD8⁺ T-cellen als de CD8⁺ T-cellen die interageren met de HLA-E/Qdm-tetrameren.

In een tweede deel van de stage werd er nagegaan op welke immunologische celtypes HLA-E op het celoppervlak tot expressie kwam. De gelijkenissen tussen HLA-E en het murine homoloog Qa-1 doen vermoeden dat HLA-E slechts in geringe mate/niet tot expressie komt op rustende T-cellen [16,37]. Dit vermoeden staat echter in contrast met de gevonden resultaten. Onze resultaten toonden immers aan dat HLA-E tot expressie kwam op alle bestudeerde immunologische celtypes. De hoogste expressie werd waargenomen op B-cellen gevolgd door de NK cellen en T-cellen ($CD4^+$ en $CD8^+$ T-cellen). Toch is dit niet verwonderlijk aangezien HLA-E een MHC klasse I molecule is (weliswaar niet klassiek) en MHC klasse I moleculen op het celoppervlak van alle cellen met een kern voorkomen [48]. Bovendien zijn deze bevindingen in lijn met eerder uitgevoerde experimenten door de groep van Geraghty, die eenzelfde patroon van HLA-E oppervlakte-expressie aantoonde [39]. Er werd namelijk aangetoond dat het antilichaam specifiek bindt aan de zware keten van HLA-E zonder kruisreactiviteit te vertonen tegen andere HLA klasse Ia moleculen [39]. Dit laatste werd nogmaals bevestigd met behulp van de controle-cellijnen, de CACO-2 en MCF-7 kankercellijnen. Eerder onderzoek [49] had aangetoond dat deze cellen positief waren voor HLA-E, dit kon echter niet uit onze resultaten besloten worden die een duidelijk negatief HLA-E oppervlakte-expressie patroon weergaven.

Volgens voorgaande onderzoeken naar Qa-1 wordt de oppervlakte-expressie ervan opgereguleerd na activatie [16]. Daarom werd in een volgend deel van de studie nagegaan of eventuele opregulatie na activatie in oppervlakte-expressie ook kon waargenomen worden bij HLA-E. Hiervoor werden de cellen gestimuleerd met *tetanus toxoid* (TT), *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) of anti-CD3. In een eerste HLA-E kinetiek-experiment werd geopteerd voor korte stimulatietijden van 3, 6, 9, 24 en 48 uur omdat gegevens in de literatuur aantoonde dat Qa-1 eerder na een aantal uur verhoogd tot expressie komt, dan na dagen [16]. Na 3 uur stimulatie werd een downregulatie in de HLA-E oppervlakte-expressie waargenomen. Van 3 tot 9 u volgde een stabilisatie van het expressie-niveau. Er kon uitgesloten worden dat de eerste afname het gevolg was van een slechtere staat van de cellen aangezien een eerste *gate* immers geplaatst werd op de levende lymfocytpopulatie. Vermits ook in de controle conditie (niet gestimuleerd) eerst een afname en vervolgens een stabilisatie waar te nemen was, wijst dit erop dat de eerste downregulatie eerder gecorreleerd is met de cel-isolatie en *in vitro* opzet, dan wel met een activatie geïnduceerd fenomeen. Uit de data bleek bovendien dat er een opregulatie in HLA-E expressie plaats vindt vanaf 24 uur indien de cellen geactiveerd werden met de verschillende stimuli. Deze opregulatie bleek het hoogst

bij anti-CD3 en TSST-1; bij stimulatie met TT vond deze toename in expressie ook plaats, doch in mindere mate. Dit kan verklaard worden doordat stimulatie met TT overeen komt met een normale activatie en processing zoals het *in vivo* plaats vindt, maar dat deze zwakker is dan stimulatie met het superantigen TSST-1 of het anti-CD3-antilichaam, die een activatie simuleert. Met behulp van TSST-1 en het anti-CD3-antilichaam worden ook meer tot alle T-cellen geactiveerd, TT kan slechts een subpopulatie T-cellen activeren. De maximale HLA-E oppervlakte-expressie werd waargenomen na een stimulatie van 24 uur. Na 48 uur was er reeds een lichte afname, maar er kan nog niets geconcludeerd worden daar het expressieniveau nog niet volledig het beginpunt terug had bereikt. Een tweede experiment met langere stimulatietijden toonde aan dat 24 uur stimulatie met anti-CD3 leidde tot een maximaal expressieniveau. In vergelijking met de activatiemarkers CD25 en CD69 kent HLA-E eenzelfde expressie-profiel als CD25 en dus later opgereguleerd worden dan CD69. Deze bevindingen zijn in lijn met literatuur over Qa-1. Er is aangetoond dat Qa-1 oppervlakte-expressie sterk opgereguleerd wordt na activatie en dat de perifere expressie slechts een korte tijd aanwezig blijft op het oppervlakte van geactiveerde CD4⁺ T-cellen [16,34,35]. HLA-E expressie kent dus net zoals Qa-1 expressie een kortleven en wordt opgereguleerd na activatie.

Op mRNA-niveau wordt er een gelijkaardig patroon verwacht, waarbij de expressie voorafgaat aan de maximale oppervlakte-expressie. Preliminair data spreken dit echter tegen. Er kan dus nog geen uitsluitsel gegeven worden over de HLA-E expressie op mRNA-niveau en de experimenten dienen nog herhaald te worden. Opvallend was de expressie van HLA-E op het mRNA-niveau in de MCF-7 cellijn, terwijl HLA-E niet tot expressie komt op het celoppervlak van deze cellijn [48]. Hieruit blijkt dat het belangrijk is, in het kader van dit onderzoek, om steeds de oppervlakte-expressie van HLA-E na te gaan. Aanwezigheid van HLA-E op mRNA-niveau vertelt immers niets over de functionaliteit van het molecuul.

In een laatste onderdeel van de stage werd de reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van geactiveerde HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen nagegaan via een CFSE proliferatie assay. De experimenten toonden aan dat de CD8⁺ T-cellen hoge reactiviteit vertoonden tegen de geactiveerde CD4⁺ T-cellen. Het incuberen van de CD8⁺ T-cellen met een antilichaam gericht tegen de klassieke MHC klasse I en II moleculen leidde niet tot een significante daling van de proliferatie. Dit doet vermoeden dat de proliferatie veroorzaakt wordt door HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen. Daarom is het interessant om dit experiment uit te voeren met geactiveerde CD4⁺ T-cellen die geïncubeerd worden met een antilichaam gericht tegen HLA-

E om deze stelling te verifiëren. Om na te gaan of de sterke proliferatie van de CD8⁺ T-cellen te wijten was aan nog aanwezige hoeveelheden CD3CD28 dynabeads gebruikt als stimulatie van de CD4⁺ T-cellen, zal een nieuw experiment opgezet worden waarbij de CD4⁺ T-cellen gestimuleerd worden met anti-CD3 en waarbij de CD4⁺ T-cellen eerst meermaals gewassen worden alvorens toe te voegen in de co-cultuur. Een andere mogelijkheid voor de sterke proliferatie van de CD8⁺ T-cellen ten opzichte van de HLA-E⁺ CD4⁺ T-cellen is de invloed van kleine hoeveelheden contaminerende B-cellen aanwezig in de geïsoleerde CD8⁺ T-cel populatie. Onderzoek van de onderzoeksgroep van Cantor had reeds aangetoond dat B-cel presentatie van Qa-1-geassocieerde peptiden CD8⁺ suppressieve activiteit kon stimuleren [50]. Eerder uitgevoerde experimenten in deze stageperiode hadden ook reeds aangetoond dat B-cellen HLA-E tot expressie brengen waardoor eventueel de CD8⁺ T-cellen gestimuleerd konden worden.

De reactiviteit van CD8⁺ T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4⁺ T-cellen werd ook nagegaan op lange termijn met behulp van een *in vitro* assay. Hierbij werd 90% van de wells positief bevonden wat in overeenstemming is met de korte termijn co-cultuur.

Het onderzoek in deze stage was gericht naar de rol van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen in gezonde controles en MS-patiënten. In deze stage zijn we erin geslaagd om CD8⁺ T-cellen te detecteren met behulp van HLA-E/Qdm tetrameren. Verder onderzoek moet uitwijzen of detectie en isolatie van HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen met behulp van HLA-E tetrameren opgeladen met Hsp60 of TCR-peptiden mogelijk is en of er eventuele verschillen zijn tussen gezonde controles en MS-patiënten, zowel op kwantitatief als functioneel gebied.

De verdere studie van eventuele verschillen tussen HLA-E gerestricteerde CD8⁺ Tregs in MS-patiënten en gezonde individuen en hun reactiviteit gericht tegen de CD4⁺ T-cellen zal hun bijdrage in het ziekteproces mogelijk ontrafelen. Deze kennis kan vervolgens bijdragen in de ontwikkeling van nieuwe en specifiekere therapieën voor MS, zoals bijvoorbeeld TCV. Experimenten van de groep Jiang *et al* hebben reeds aangetoond dat TCV regulatoire CD8⁺ T-cellen kan induceren die specifiek reageren tegen pathogene CD4⁺ T-cellen [14]. Deze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat injectie met geactiveerde CD4⁺ Vβ8⁺ T-cellen leidde tot de inductie van Vβ8-specifieke Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cellen. Deze CD8⁺ T-cellen lyserden de *in vitro* geactiveerde autologe CD4⁺ Vβ8⁺ T-cellen, maar waren niet in staat T-

cellen te lyseren die een andere V β TCR tot expressie brachten. Deze V β -specifieke lysis vereiste de expressie van Qa-1-TCR-peptidecomplex op de targetcel en werd geïnhibeerd door antilichamen gericht tegen Qa-1 [14]. Een meer eenvoudige aanpak bij de mens kan eventueel vaccinatie zijn met TCR V β peptiden die via antigen presenterende cellen gepresenteerd worden aan HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen, waardoor autoreactieve T-cellen onderdrukt kunnen worden.

De vraag of HLA-E gerestricteerde CD8⁺ T-cellen in de mens eenzelfde rol als Qa-1 gerestricteerde CD8⁺ T-cellen in diermodellen vervullen in gezonde individuen en MS-patiënten, blijft momenteel nog onbeantwoord. Een verdere karakterisatie van deze cellen zal noodzakelijk zijn om een antwoord te geven op deze vraag en mogelijke therapieën voor MS.

Referenties

1. Charcot J. Histologic de la sclerose en plaque. *Gaz Hôp* 1868;41 :554-66.
2. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis. *Annu Rev Med*. 2002;53:285-302.
3. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8⁺ T cells in MS: a new target for therapy? *Brain* 2005;128:1747-63.
4. URL:<http://www.ms-gateway.nl>
5. Buntinx M, Stinissen P, Steels P, Ameloot M, Raus J. Immune-mediated Oligodendrocyte injury in Multiple Sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Crit Rev Immunol*. 2002;22:391-424.
6. Serjeantson SW, Gao X, Hawkins BR, Higgins DA, Yu YL. Novel HLA-DR2-related haplotypes in Hong Kong Chinese implicate the DQB1*0602 allele in susceptibility to multiple sclerosis. *Eur J immunogenet*. 1992;19:11-9.
7. Fogdell-Hahn A, Ligiers A, Groning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens*. 2000;55:140-8.
8. Oksenberg JR, Gaiser CN, Cavalli-Sforza LL, Steinman L. Polymorphic markers of human T-cell receptor alpha and beta genes. Family studies and comparison of frequencies in healthy individuals and patients with multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Hum Immunol*. 1988;22:111-21.
9. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. *Immunol Res*. 2002;25:27-51.
10. Hafler DA, Weiner HL. In vivo labeling of blood T cells: rapid traffic into the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1987;22:89-93.
11. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991;28:254-60.
12. Hohlfeld R, Wekerle H. Autoimmune concepts of MS as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;5:14599-606.
13. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology*. 1998;51:682-9.
14. Jiang H, Kashleva H, Xu LX, Forman J, Flaherty L, Pernis B, Braunstein NS, Chess L. T cell vaccination induces T cell receptor Vβ-specific Qa-1 restricted regulatory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4533-7.
15. Hellings N, Raus J, Stinissen P. T-cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action. *Autoimmun Rev*. 2004;3:267-75.

16. Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, Jiang H, Chess L. Induction of TCR Vbeta specific CD8⁺ CTLs by TCR Vbeta derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol.* 2001;167:3800-8.
17. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: A large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000;13:829-40.
18. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114:1198-1208.
19. Charlton B, Lafferty KJ. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:793-8.
20. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:535-62.
21. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest.* 2002;110:793–800.
22. Ille's Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol.* 2000;164:4375–4381.
23. Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L *et al.* Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005;35:3343-52.
24. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;7:971-9.
25. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-6.
26. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2005;204:195-207.
27. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10 producing and naturally occurring Tregs: Limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 2004;114:1372-8.
28. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
29. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1997;18:335-43.
30. Correale J, Rojany M, Weiner LP. Human CD8⁺ TCR-alpha beta(+) and TCR-gamma delta(+) cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific CD4⁺ T-cells by different mechanisms. *J Neuroimmunol.* 1997;80:47-64.
31. Cohen IR, Quintana FJ, Mimran A. Tregs in TCV: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest.* 2004;114:1227-32.

32. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, et al. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest*. 2003;112:1037-48.
33. Noble A, Zhao ZS, Cantor H. Suppression of immune responses by CD8 cells. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J Immunol*. 1998;160:566-71.
34. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1 deficient mice. *Nat Immunol*. 2004;5:516-23.
35. Chess L, Jiang H. Resurrecting CD8⁺ suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2004;5:469-71.
36. Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N, Feinberg E, Wang R, Wucherpfennig KW, Cantor H. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest*. 2004;113:1218-24.
37. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*. 1998;160:4951-60.
38. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of Human HLA-E complexed with HLA class I signal sequence derived peptides by CD94/NKG2 converts protection from NK cell mediated lysis. *J Exp Med*. 1998;187:813-8.
39. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, López-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the NK inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:5199-204.
40. Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep Biochem*. 1972;2:139-65.
41. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26:124-5.
42. VanderBorght A, van der Aa A, Geusens P, Vandevyver C, Raus J, Stinissen P. Identification of overrepresented T cell receptor genes in blood and tissue biopsies by PCR-ELISA. *J Immunol Methods*. 1999;223:47-61.
43. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 2000;243:147-54.
44. Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 2001;253:177-87.
45. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Doouek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004;103:4222-31.
46. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, D'hooghe MB, Dubois B, Raus J, Stinissen P. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients

- show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res.* 2006;83:432-46.
47. Jiang H, WuY, Liang B, Zheng Z, Tang G, Kanellopoulos J, Soloski M, Winchester R, Goldstein I, Chess L. An affinity/avidity model of peripheral T cell regulation. *J Clin Invest.* 2005;115:302-12.
48. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. In: *Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company; 2003
49. Palmisano GL, Contardi E, Morabito A, Gargaglione V, Ferrara GB, Pistillo MP. HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines. *Hum Immunol.* 2005;66:1-12.
50. Noble A, Zhao ZS, Cantor H. Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J Immunol.* 1998;160:566-571

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

De rol van HLA-E gerestricteerde CD8+ T-cellen in Multiple Sclerose

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Evelien WILLEM

Datum: